

Université de Montréal

Effet de la N-acétylcystéine sur la dysfonction endothéliale des artères
coronaires épicaudiques associée à une hypertrophie ventriculaire gauche
dans un modèle porcin

Par
Alexandra Annaïk Horn

Département de Pharmacologie
Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pharmacologie

Avril 2010

© Alexandra Annaïk Horn, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effet de la N-acétylcystéine sur la dysfonction endothéliale des artères
coronaires épicardiques associée à une hypertrophie ventriculaire gauche
dans un modèle porcin

Présenté par
Alexandra Annaïk Horn

a été évalué par un jury composé des personnes
suivantes :

Dr Eric Thorin

Président-rapporteur

Dr Louis P. Perrault

Directeur de recherche

Dr Denis deBlois

Membre du jury

Résumé

Effet positif de la N-acétylcystéine sur la dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques associée à une hypertrophie ventriculaire gauche dans un modèle porcin

A. A. HORN, M-C AUBIN, YF SHI, J-C TARDIF, M. CARRIER, L. P. PERRAULT
INSTITUT DE CARDIOLOGIE DE MONTRÉAL, MONTRÉAL, CANADA,

Objectif : Il a été démontré dans le laboratoire que dans notre modèle d'hypertrophie ventriculaire gauche, la dysfonction endothéliale est secondaire à une diminution de la biodisponibilité du NO, celle-ci étant causée par une augmentation du stress oxydant tel que démontré par Malo et al. (2003) et Aubin et al. (2006). Le but de la présente étude est d'étudier l'effet d'un traitement chronique de la N-acétylcystéine (NAC) (un antioxydant) sur la dysfonction endothéliale associée à une hypertrophie ventriculaire gauche (HVG).

Méthodologie: L'HVG a été induite par cerclage aortique (CA) chez vingt-et-un porcelets âgés de deux mois qui furent divisés aléatoirement en quatre groupes expérimentaux. Le groupe témoin (groupe 1) a été soumis à une thoracotomie antérolatérale gauche sans cerclage aortique (n=3). Le groupe 2 a été soumis à un cerclage aortique pour une période de 60 jours (n=6). Le groupe 3 a subi un cerclage aortique et a reçu un traitement oral de N-acétylcystéine de 1000 mg/jour *per os* pendant 60 jours commençant le jour de la chirurgie (n=6). Le groupe 4 a été soumis à un cerclage aortique et a reçu un traitement oral de N-acétylcystéine : 1000 mg/par jour pendant 30 jours commençant le jour 30 (post-chirurgie) (n=6). L'hypertrophie fut évaluée par échocardiographie. La réactivité vasculaire fut étudiée à l'aide de chambres d'organes par la construction des courbes concentration-réponse à la sérotonine (5-HT: relaxations induites par les récepteurs 5-HT_{1D}, couplés aux protéines Gi) et à la bradykinine (BK: relaxations induites par les récepteurs B₂, couplés aux protéines Gq). Les quantités de nitrites/nitrates et la production basale de GMPc ont été mesurées pour évaluer la fonction endothéliale. Le stress oxydant a été étudié en quantifiant les concentrations plasmatiques d'hydroperoxydes lipidiques et de glutathion réduit, ainsi que l'activité plasmatique des enzymes antioxydantes peroxydase du glutathion et dismutase du superoxyde.

Résultats: Le rapport masse ventricule gauche/masse corporelle était significativement plus élevé pour le groupe 2 comparativement au groupe 1 (p<0,05) confirmant la présence d'une HVG. Le développement de l'HVG dans le groupe 3 a pu être prévenu par la NAC et sa progression fut atténuée dans le groupe 4 (p<0,05 versus groupe 2). La présence de la dysfonction endothéliale a été confirmée chez le groupe 2, tel qu'illustré par une diminution significative des relaxations maximales à la 5-HT et à la BK comparativement au groupe témoin. Le traitement à la NAC a significativement potentialisé les relaxations maximales (p<0,05) induites par la sérotonine et par la bradykinine, chez les deux groupes traités. Cette amélioration des relaxations dépendantes de l'endothélium peut être la conséquence d'une augmentation significative (p<0,05) de la biodisponibilité du monoxyde d'azote pour les

cellules musculaires lisses, tel que suggéré par l'augmentation du ratio nitrites/nitrates et de la production basale de GMPc chez les groupes 3 et 4 comparativement au groupe 2. Cette augmentation du facteur relaxant peut résulter d'une augmentation de sa production par les cellules endothéliales ou d'une diminution de sa neutralisation par les espèces réactives oxygénées. De fait, les concentrations d'hydroperoxydes lipidiques étaient significativement inférieures ($p < 0,05$) et associées à une augmentation des concentrations de l'antioxydant glutathion réduit et de l'activité de la peroxydase du glutathion chez les deux groupes traités par rapport au groupe 2.

Conclusion: Le traitement à la NAC prévient le développement de la dysfonction endothéliale coronaire ainsi que l'HVG qui lui est associée.

Mots-clés : Dysfonction endothéliale-Antioxydant-Hypertrophie ventriculaire gauche-Stress oxydant

Abstract

Beneficial effect of N-acetylcysteine on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy in a porcine model

A.A. HORN, M-C AUBIN, YF SHI, J-C TARDIF, M. CARRIER, L. P. PERRAULT

MONTREAL HEART INSTITUTE, MONTREAL, CANADA

Objective : In our left ventricular hypertrophy (LVH) model, endothelial dysfunction is secondary to a reduced bioavailability of NO caused by increased oxidative stress demonstrated by Malo and al. (2003) and Aubin and al. (2006). The aim of this study was to investigate the potential effect of chronic administration of N-acetylcysteine (NAC), a thiol drug with antioxidant properties, on the coronary endothelial dysfunction associated with LVH.

Design and method: LVH was induced by aortic banding (AB) on swine for a two-month period. Twenty-one 8-week-old Landrace male swine were randomly divided into 4 experimental groups. The sham group (group 1) was submitted to a thoracotomy without aortic banding (AB). The untreated aortic banded group (group 2) was kept for 60 days. The first AB treated group (group 3) received 1000mg/day of NAC *per os* for 60 days starting on the day of the surgery. The second AB treated group (group 4) received the same oral dose of NAC for 30 days starting on day 30. Hypertrophy was assessed by echocardiography. Coronary vascular reactivity was evaluated in organ chambers, by the construction of concentration-response curves to serotonin (5-HT: relaxations mediated by 5-HT_{1D} receptors, coupled to Gi proteins) and bradykinin (BK: relaxations mediated by B₂ receptors, coupled to Gq proteins). Levels of nitrite/nitrate and basal cGMP levels were measured to evaluate endothelial dysfunction. Finally, to assess oxidative stress, plasma lipid hydroperoxide levels (LPO), reduced glutathione as well as the activity of antioxidant enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutase were measured.

Results: The LV mass/ body weight ratio was significantly higher in group 2 compared to group 1 confirming the development of LVH ($p < 0.05$). The latter was found to be associated with a significant endothelial dysfunction. NAC did prevent LVH development in group 3 and attenuated its progression in group 4 ($p < 0.05$). Concentration response curves to NAC showed improvement in endothelium-dependent relaxations to serotonin and to bradykinin ($p < 0.05$). NAC treatment markedly improved maximal relaxations mediated by serotonin and bradykinin in both treated groups ($p < 0.05$). The observed improvement in endothelium-dependent relaxations was supported by the increase of the bioavailability of NO for smooth muscle cells as suggested by the increase of the nitrite/nitrate ratio and the basal production of cGMP in groups 3 and 4 in comparison to group 2 ($p < 0.05$). The increase of this relaxing factor could result from an increase of its production by endothelial cells or by a decrease of its neutralization by

reactive oxygenated species. The lowering of LPO levels was accompanied by a higher glutathione concentration and glutathione peroxidase activity in both NAC treated groups compared to group 2 ($p < 0.05$).

Conclusions: NAC treatment demonstrated potent antioxidant properties in this porcine LVH model by slowing LVH development and restoring coronary endothelium-dependent relaxations.

Key words: Endothelial dysfunction-Antioxidant-Left ventricular hypertrophy-Oxidative stress

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Liste des figure	x
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xiv
1. Introduction	2
1.1 Présentation	2
1.2 Endothélium	4
1.3 Facteurs relaxant dérivés de l'endothélium	5
1.3.1 Monoxyde d'azote	6
1.3.1.1 Synthèse du NO	6
1.3.1.2 Isoformes de la NO synthase (NOS)	8
1.3.1.3 Structure et régulation des NO synthases	8
1.3.1.4 Effets du NO	12
1.3.2 Prostacycline	13
1.3.3 EDHF	15
1.4 Facteurs contractant dérivés de l'endothélium	16
1.4.1 Endothéline-1	16
1.4.1 Angiotensine-II	18
1.4.2 Thromboxane A ₂	20
1.4.3 Prostacycline	20
1.5 Stress oxydant	21
1.5.1 Espèces réactives oxygénées (ERO)	21
1.5.1.2 Anion superoxyde	22
1.5.1.3 Ion peroxynitrite	23
1.5.1.4 Peroxyde d'hydrogène	24
1.5.2 Sources endothéliales	24
1.5.2.1 NADPH oxydase	25
1.5.2.2 Mitochondrie	25
1.5.2.3 Cytochrome P450	26
1.5.2.4 Xanthine oxydase/déshydrogénase	27
1.5.2.5 eNOS	27

1.5.3 Enzymes antioxydantes	27
1.5.2.1 Dismutase du superoxyde (SOD)	27
1.5.2.2 Peroxydase du glutathion	28
1.5.2.3 Catalase	30
1.6 Hypertrophie ventriculaire gauche (HVG)	30
1.7 N-acétylcystéine (NAC)	36
2. Hypothèses et buts	40
3. Matériel et méthode	41
3.1 Groupes expérimentaux	41
3.2 Procédure chirurgicale	42
3.3 Évaluation échocardiographique	43
3.3.1 Paramètres hémodynamiques du cerclage aortique	43
3.3.2 Hypertrophie ventriculaire gauche	44
3.4 Sacrifice et prélèvement des artères coronaires épicardiques	44
3.5 Étude de la réactivité vasculaire	45
3.5.1 Relaxations dépendantes de l'endothélium	46
3.5.2 Relaxations indépendantes de l'endothélium	46
3.6 Évaluation de la fonction endothéliale	46
3.6.1 Quantification plasmatique des nitrites et de nitrates (NOx)	46
3.6.2 Quantification de la production basale vasculaire du GMPc	47
3.7 Évaluation du stress oxydant	47
3.7.1 Taux plasmatiques d'hydroperoxydes lipidiques	47
3.7.2 Dismutase vasculaire du superoxyde (SOD)	48
3.7.3 Peroxydase du glutathion	48
3.7.4 Glutathion réduit (GSH)	48
3.8 Solutions et produits	49
3.9 Analyse statistique et interprétation des données	49
4. Résultats	51
4.1 Résultats échocardiographiques	51
4.2 Étude de la réactivité vasculaire	53
4.2.1 Relaxations dépendantes de l'endothélium	53
4.2.2 Relaxations indépendantes de l'endothélium	57
4.3 Fonction endothéliale	58
4.3.1 Concentrations plasmatiques de nitrites/nitrates	58

4.3.2 Concentrations vasculaires de GMPc	59
4.4 Stress oxydant.....	60
4.4.1. Concentrations plasmatiques d'hydroperoxydes lipidiques	60
4.4.2 Activité vasculaire de la dismutase du superoxyde	61
4.4.3 Concentrations plasmatiques du glutathion réduit.....	62
4.4.4 Activité de la peroxydase de glutathion vasculaire	63
5. Discussion	64
5.1 Introduction	64
5.2 Stress oxydant et hypertrophie cardiaque.....	65
5.3 Glutathion.....	66
5.3.1 Concentrations plasmatiques de glutathion	67
5.4 Relaxations dépendantes de l'endothélium	68
5.5 Relaxations indépendantes de l'endothélium	69
5.6 Activité de la peroxydase de glutathion	69
5.7 Concentrations plasmatiques d' hydroperoxydes lipidiques	70
5.8 Limites de l'étude	70
6. Conclusion.....	72
7. Bibliographie	73

Liste des figure

Figure 1. Synthèse du monoxyde d'azote.

Figure 2. Transformation de l'anion superoxyde en eau.

Figure 3. Dégradation de l'anion superoxyde.

Figure 4. Formule chimique de la N-acétylcystéine

Figure 5. Courbes cumulatives concentration-réponse à la sérotonine (5-HT) des anneaux des artères coronaires épicaudiques.

Figure 6. Courbes cumulatives concentration-réponse à la bradykinine (BK) des anneaux des artères coronaires épicaudiques

Figure 7. Courbes cumulatives concentration-réponse au sodium nitroprussiate (SNP) des artères coronaires épicaudiques.

Figure 8. Concentrations plasmatiques de nitrites/nitrates

Figure 9. Concentrations vasculaires de GMPc

Figure 10. Concentrations plasmatiques des hydroperoxydes lipidiques

Figure 11. Activité vasculaire de la dismutase du superoxyde

Figure 12. Concentrations plasmatiques de glutathion réduit

Liste des tableaux

Tableau 1. Groupes expérimentaux

Tableau 2. Données échocardiographiques

Tableau 3. Données morphologiques

Tableau 4. Emax des courbes concentration-réponse induites
par la sérotonine et la bradykinine

Liste des abréviations

5-HT:	Sérotonine
AA:	Acide arachidonique
AB:	Aortic banding- Cerclage aortique
AC:	Adénylate cyclase
ACh:	Acétylcholine
ACV:	Accidents cérébraux vasculaires
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADP:	Adénosine diphosphate
Akt:	Protéine kinase α -sérine/thréonine
AMPc:	Adénosine monophosphate cyclique
ANG:	Angiotensine
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
AT1/AT2:	Récepteur de types 1 et 2 de l'angiotensine II
AT III:	Antithrombine III
ATP:	Adénosine triphosphate
β_1 AR	Récepteur bêta 1 adrénergique
β_2 AR	Récepteur bêta 2 adrénergique
B2:	Récepteur de bradykinine B2
BH4:	Tétrahydrobioptérine
BK:	Bradykinine
Ca ⁺⁺ :	Calcium
CA:	Cerclage aortique
CaM:	Calmoduline
CaV-1:	Cavéoline-1
NO:	Monoxyde d'azote
COX:	Cyclooxygénase
DAG:	Diacylglycérol
ECA:	Enzyme de conversion de l'angiotensine
EDCF:	Facteurs contractants dépendants de l'endothélium
EDHF:	Facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium
EDRFs:	Facteurs relaxants dépendants de l'endothélium
EET:	Acide époxyécosatriénoïque
eNOS:	Monoxyde d'azote synthétase endothéliale
Epac	Protéine échangeuse qui se lie directement à l'AMPc
ERO:	Espèces oxygénées activées
ET-1:	Endothéline-1
ETA:	Récepteur de type A de l'endothéline
ETB:	Récepteur de type B de l'endothéline
FAD:	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
GC :	Guanylate cyclase
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique
GPx-1 :	Peroxydase de glutathion de type 1
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxydé
HSP :	Protéine de choc thermique
HVG :	Hypertrophie ventriculaire gauche
H ₂ O :	Eau
iNOS :	Monoxyde d'azote synthétase inductible

IP :	Récepteur à la prostacycline
Kca	Canal calcique
Mg ⁺⁺ :	Magnésium
MLCK :	Kinase de chaîne légère de myosine
Mn ⁺⁺ :	Manganèse
NAC :	N-acétylcystéine
NADPH :	Nicotine amide adénine dinucléotide diphosphate
nNOS :	Monoxyde d'azote synthétase neuronale
OH [·] :	Radical hydroxyle
ONOO-	Ion peroxytrite
PGI ₂ :	Prostacycline
PGH ₂ :	Prostaglandine
SH :	Groupe sulfhydryl
SHR :	Rats spontanément hypertendus
SOD :	Dismutase du superoxyde
TP :	Récepteur à la thromboxane A ₂
VEGF :	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur, le Dr Louis P. Perrault, qui m'a donné l'opportunité de pouvoir faire ma maîtrise dans son laboratoire de chirurgie expérimentale.

Marie-Claude Aubin, s'est continuellement montrée prête à répondre à mes questions, à m'aider avec mon projet et me donner de précieux conseils. Mille fois merci!

Je remercie aussi Stéphanie Blanchet. Constamment de bonne humeur et prête à m'aider avec mes travaux même si elle était très occupée à de multiples tâches. Heureusement qu'elle était dans le laboratoire pour me faire rire pendant les chirurgies!

Je remercie également la Dre Yan Fen Shi qui a toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses questions et à m'expliquer les fondements de l'échographie.

Merci au Dr Stacey Brann qui m'a toujours encouragée à continuer malgré les nombreux obstacles à franchir. Il a toujours su me faire rire et m'a donné de nombreux conseils pour la suite de mes études.

Merci aux employés très dévoués de l'animalerie de l'Institut de Cardiologie de Montréal qui se sont occupés de la santé et du bien-être de mes « porcs ».

Je tiens également à remercier les membres de mon jury, le Dr Eric Thorin (président-rapporteur) et le Dr Denis deBlois (membre du jury) qui ont accepté de corriger ce mémoire malgré un horaire de travail qui doit être très chargé.

Merci à Madame Sylvie Caron et Madame Francine Côté du Département de Pharmacologie pour leur gentillesse et leur disponibilité à mon égard.

Merci à Daisy, MB et Rowena de l'Université de Salamanque.

Finalement, je tiens à remercier mes parents pour leur amour, leur soutien, leurs encouragements, leur générosité. Ils ont su m'inculquer le goût de la connaissance et le don de la persévérance. ¡Gracias por ser mis padres!

«Chaque publication scientifique
ne sert qu'à poser 10, 20 questions.
Chaque découverte scientifique est
passionnante parce qu'elle
ouvre un univers de questions.
Si les questions vous angoissent,
ne soyez pas scientifique. »

Boris Cyrulnik

1. Introduction

1.1 Présentation

L'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) est un processus adaptatif qui survient en réponse à une augmentation du travail cardiaque. On distingue l'HVG concentrique (suite à une augmentation de pression) et l'HVG excentrique (suite à une surcharge de volume). La surcharge de pression aboutit à une addition en parallèle de nouveaux sarcomères, accompagnée ou non d'une diminution du diamètre interne du ventricule gauche. La surcharge volumique entraîne une addition de sarcomères en série. Ceci entraîne une augmentation du volume et de l'épaisseur de la paroi du ventricule gauche (*Cohen et al. 2002*). L'HVG concentrique peut être causée par l'hypertension ou une sténose aortique et elle triple le risque de développer des maladies cardiovasculaires comme la mort subite, l'insuffisance cardiaque, l'accident vasculo-cérébral, l'infarctus du myocarde et les cardiomyopathies. L'HVG est l'une des pathologies cardiovasculaires les plus fréquentes des pays développés (*Bauml et al. 2010*).

L'endothélium joue de multiples rôles dont celui de barrière sélective entre le sang et les cellules musculaires lisses et de contrôle du tonus vasculaire. Plusieurs études cliniques et fondamentales ont montré que les sujets atteints d'HVG avaient des relaxations dépendantes de l'endothélium induites par l'acétylcholine ou la substance P altérées (*Grieve et al. 2001*). Ces modifications favorisent le développement d'une dysfonction endothéliale, un terme apparu dans les années 80 qui décrit une atteinte de la capacité vasodilatatrice coronarienne due à une baisse de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO), à une augmentation simultanée de prostanoïdes et de facteurs vasoconstricteurs dépendant de l'endothélium comme l'endothéline-1. La dysfonction

endothéliale est aussi caractérisée par une présence accrue du stress oxydatif qui favorise une libération plus prononcée d'espèces réactives oxygénées et de radicaux libres.

Les études conduites auparavant dans notre laboratoire ont permis de caractériser les modifications des voies de transduction de signal des cellules endothéliales des artères coronaires épocardiques observées dans un modèle porcin atteint d'une HVG. Malo et al. (2003) ont démontré que cette dysfonction endothéliale affectait les relaxations dépendant de l'endothélium induites par les agonistes et activant les récepteurs couplés aux protéines Gi et Gq. Cette diminution des relaxations maximales était associée à une baisse de la biodisponibilité du NO malgré une préservation de l'expression de la synthétase endothéliale du NO (eNOS). Desjardins et al. (2003) ont démontré que cette dysfonction endothéliale était en partie expliquée par une élévation des concentrations plasmatiques d'endothéline-1 (ET-1) et une augmentation de son action contractile au niveau du récepteur ET_A. De fait, l'expression de ce sous-type de récepteur a été démontrée comme étant couplée à une diminution de celle des récepteurs ET_B au niveau des cellules musculaires lisses des artères coronaires. En 2003, Malo et al. ont confirmé qu'un traitement à la tétrahydrobioptérine et qu'une administration *ex vivo* d'antioxydants (superoxyde dismutase et catalase) étaient efficaces pour rétablir les relaxations en présence de la dysfonction endothéliale associée à l'HVG. Ces résultats ont été confirmés par l'étude d'Aubin et al. (2006) qui atteste qu'une administration chronique *per os* du probucol (un antioxydant) prévient, freine et renverse la formation de la dysfonction endothéliale en augmentant la biodisponibilité du NO. Ceci semble être la conséquence d'une diminution du stress oxydant puisque les concentrations plasmatiques d'hydroperoxydes lipidiques et d'angiotensine-II sont significativement réduites par le

traitement antioxydant. Les thiols sont indispensables à la vie biologique car ils défendent l'organisme contre les espèces réactives oxygénées. Le glutathion, un des antioxydants les plus étudiés, est synthétisé à travers tout le corps humain de façon endogène. Un état redox optimal est d'une importance majeure pour permettre à la cellule de lutter contre le stress oxydant. Le maintien d'une biodisponibilité sanguine de la cystéine est un facteur limitant dans la synthèse du glutathion (*Kerksisck et al. 2005*). Une administration de NAC est une des alternatives les plus efficaces pour préserver une réserve de cystéine. Il serait donc intéressant d'étudier les effets potentiels d'une administration chronique de l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC) sur la dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques associée à une HVG dans un modèle porcin.

1.2 Endothélium

L'endothélium vasculaire est une mince monocouche de cellules qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins. Il forme une barrière entre le sang circulant et la paroi des vaisseaux sanguins. L'endothélium est présent dans tout le système circulatoire (de la sortie du cœur jusqu'aux plus petites ramifications du système vasculaire). Au niveau des capillaires, l'endothélium est la seule couche de cellules présente. Le nombre de cellules endothéliales est environ de 10^{13} au total. Il pèse 1,5 kg et occupe une surface de 4000 à 7000 m² selon les études. L'endothélium a un rôle important dans sa participation à la fonction physiologique normale de la paroi vasculaire (*Ait-Oufella et al. 2007*).

L'endothélium joue un rôle pendant l'hémostase primaire en sécrétant le facteur von Willebrand (qui va se déposer sur l'endothélium lésé). Il a aussi des propriétés anticoagulantes (grâce à la présence de deux glycosaminoglycans : le dermatane sulfate et l'héparane sulfate) et coagulante (expression du facteur tissulaire) (*Rosenberg et al.*

1989; Rosenberg et al. 1984). De plus, il peut aussi stimuler la fibrinolyse en sécrétant l'activateur tissulaire du plasminogène. En condition normale, l'endothélium ne favorise pas l'adhésion de leucocytes sur la paroi vasculaire mais lors des processus inflammatoires, il favorise la transmigration leucocytaire (Todd et al. 1959 ; Ait-Oufella et al. 2007). De plus, lors de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, des signaux angiogéniques sont envoyés aux cellules endothéliales pour stimuler leur prolifération, leur conférer une meilleure résistance à l'apoptose, réorganiser leur cytosquelette et favoriser leur migration. Cette cascade de signalisations est induite par les MAPK. Le système phosphatidylinositol 3-kinase/ protéine kinase B est particulièrement important pour la survie angiogénique de l'endothélium. Selon les tissus, les cellules endothéliales peuvent aussi réguler le tonus vasculaire, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (Ait-Oufella et al. 2007 ; Weinbaum et al. 2007; Patel et al. 2001).

L'endothélium peut être stimulé par une variété de différents facteurs : les forces de cisaillement, des facteurs synthétisés par des molécules circulantes sanguines ou par des facteurs libérés par le vaisseau lui-même. En voici quelques exemples : la vasopressine, le peptide vasoactif intestinal, la sérotonine et la thrombine (toutes deux dérivant des plaquettes), les acides gras insaturés et saturés, l'histamine, l'endothéline-1, l'acétylcholine, l'ADP et la bradykinine (dérivant des cellules musculaires lisses et de l'endothélium) (Vanhoutte et al. 2003).

1.3 Facteurs relaxant dérivés de l'endothélium

L'endothélium qui est un organe régulant de nombreuses fonctions vasculaires peut synthétiser et sécréter, sous l'action de différents agonistes, des substances vasoactives qui vont diffuser vers les cellules musculaires lisses et induire une relaxation.

Ces substances, appelées facteurs relaxant dérivés de l'endothélium (EDRF) sont : le monoxyde d'azote, la prostacycline et l'EDHF.

1.3.1 Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) fut découvert en 1772 par Joseph Priestly. C'est un gaz liposoluble et invisible ayant une durée de vie de 1 à 5 s *in vivo*. Les propriétés relaxantes des cellules musculaires du NO ont été découvertes en envoyant un mélange de NO et d'azote ou d'argon dans des chambres d'organes contenant des anneaux d'artères coronaires bovines pré-contractées en 1979. En 1980, Furchgott et Zawadski ont découvert que lorsque des vaisseaux pré-contractés (ayant un endothélium intact) étaient soumis à une dose d'acétylcholine exogène, les cellules endothéliales pouvaient synthétiser un EDRF. En absence d'endothélium, l'effet de l'acétylcholine disparaissait. Cette étude démontra que les cellules endothéliales synthétisaient une substance labile d'origine non prostanoïde, l'EDRF, lorsque l'endothélium était stimulé par des agonistes comme l'acétylcholine pour produire une relaxation vasculaire. En 1987, deux études menées par les chercheurs Moncada et al. 1987 (*Palmer et al. 1987*) et Ignarro et al.(1988) démontrèrent que le NO était en fait l'EDRF. Le prix Nobel en Physiologie et en Médecine fut décerné en 1998 à Robert Furchgott, Louis Ignarro et Ferid Murad pour la découverte des rôles physiologiques de cette molécule et de ses voies de signalisation (*Sanders et al. 2000*).

1.3.1.1 Synthèse du NO

En 1989, une étude démontra la présence d'une enzyme cytosolique, qui, en présence de calcium, pouvait transformer la L-arginine en L-citrulline et en un composé qui induit la vasorelaxation via la guanylate cyclase soluble (*Mayer et al. 1989*). À présent, on sait que le NO est synthétisé à partir de la L-arginine par l'une des trois

isoformes de la synthétase du monoxyde d'azote synthase (NOS). Pour former le NO, ces enzymes utilisent la L-arginine, l'oxygène et la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). La formation de NO endothélial est accompagnée de la production de la L-citrulline lors de cette réaction. La flavine adénine dinucléotide diphosphate (FAD), la flavine mononucléotide (FMN), le groupement calcium/calmoduline et la tétrahydrobioptérine sont des cofacteurs essentiels de cette réaction (*Lowenstein et al. 1994*).

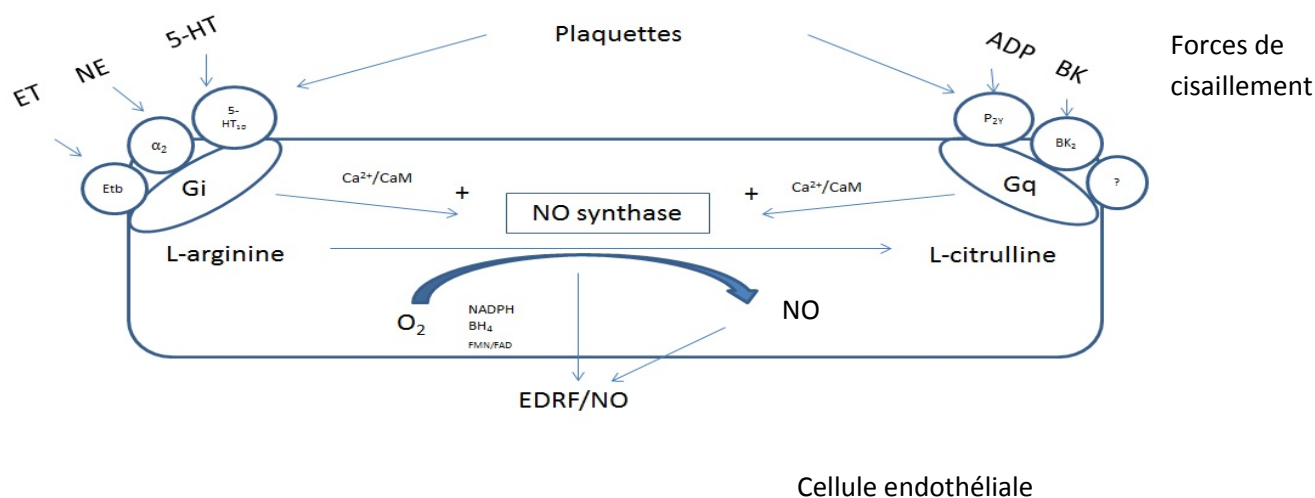


Figure 1. Synthèse du monoxyde d'azote.

NO : monoxyde d'azote ; BK : bradykinine ; 5HT : sérotonine ; ET : endothéline ;
 NE : norépinéphrine ; ADP : adénosine diphosphate ; Ca⁺⁺ : calcium ; CaM :
 calmoduline ; BH₄ : tétrahydroptérine ; O₂ : oxygène ; NADPH : nicotinamide adénine
 dinucléotide phosphate ; FMN : flavine mononucléotide ; FAD : flavine adénine
 dinucléotide. Gi et Gq : protéines ; α₂ : récepteur de norépinéphrine ; P2Y : récepteur de

l'ADP ; BK₂ : récepteur de la bradykinine ; 5-HT_{1D} : récepteur de la sérotonine ; ETb : récepteur à l'endothéline.

1.3.1.2 Isoformes de la NO synthase (NOS)

La première isolation de la NOS a été faite dans le cerveau en 1990. Cette NOS neuronale (nNOS ; forme constitutive ; NOS I) fut ultérieurement retrouvée dans les cellules endothéliales et dans les neurones. En 1991, la forme endothéliale de la NOS (eNOS; exprimée de façon constitutive ; NOS III) fut isolée à partir de cellules endothéliales provenant d'aortes bovines (*Liu et al. 2008*). Aujourd'hui, elle peut être trouvée dans des cellules endothéliales de capillaires, de veines, dans les myocytes ventriculaires et dans les nœuds sino-atrial et atrio-ventriculaire. La forme inductible de la NOS (iNOS ; NOS II) fut initialement découverte dans les macrophages (*Michel et al. 2010*). Il est maintenant établi que cette forme est exprimée dans différents organites, types ou structures cellulaires (tels que les neutrophiles, la membrane de l'appareil de Golgi, les noyaux des adipocytes bruns, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cardiomyocytes) après quelques heures suite à une exposition à des cytokines ou des agents pathogènes pour la défense de l'hôte (*Sanders et al. 2000*).

1.3.1.3 Structure et régulation des NO synthases

Les trois isoformes de la NO synthase sont homodimériques : elles sont formées de deux domaines reliés à un groupement prosthétique constitué d'une protoporphyrine IX ferrique, d'une flavine adénine dinucléotide (FAD), d'une flavine mononucléotide (FMD) et d'une molécule de tétrahydrobioptérine (BH₄). L'activité des trois isoformes dépend de la liaison à la calmoduline une protéine ubiquitaire qui se lie au calcium. L'augmentation des concentrations intracellulaires du calcium est nécessaire pour avoir

une activation optimale des enzymes eNOS, nNOS et iNOS. (*Sanders et al. 2000 ; Tfelt-Hansen et al. 2005*).

L'eNOS peut aussi être régulée par deux mécanismes différents. Le principal stimulus physique est l'augmentation des forces de cisaillement (dû à l'écoulement du sang). Il s'en suit une activation d'une protéine kinase Akt/PKB (protéine kinase B) qui phosphoryle le résidu Ser-1179 de la eNOS (*Li et al. 2009*). L'enzyme est alors activée et permet donc la synthèse de NO. L'eNOS peut être activée par le VEGF, la sphingosine-1-phosphate et l'œstrogène (*Igarashi et al. 2003 ; Boo et al. 2002*). L'eNOS peut être aussi régulée par les MAP kinases ("mitogen activated protein" kinases) via des agonistes de calcium. Les MAP kinases diminueraient l'activité de l'eNOS via la stimulation de l'oestradiol. L'eNOS peut être phosphorylée sur trois résidus : sérine, thréonine, et tyrosine. Les résidus les plus connus sont Ser 1177 (eNOS humaine) ou Ser 1179 (eNOS bovine) et Thr 495 (eNOS humaine) ou Thr 497 (eNOS bovine) (*Korkmaz et al. 2005*). De nombreuses kinases modulent l'activité de l'eNOS en phosphorylant la sérine en position 1177. L'activité de l'eNOS peut être inhibée en phosphorylant la thréonine en position 495. Une régulation coordonnée de l'activité de l'eNOS par l'agoniste VEGF induirait la phosphorylation de sérine 1177 et la déphosphorylation de la thréonine 497 (*Kupatt et al. 2007 ; Schmitt et al. 2008*). De plus, d'autres études ont démontré que la protéine kinase A (PKA) entraînerait la phosphorylation de la sérine 1177 et la déphosphorylation de la thréonine 497 et donc augmenterait l'activité de l'eNOS. Par contre, la protéine kinase C (PKC) induirait une déphosphorylation de la sérine 1177 et la phosphorylation de la thréonine 497. Ceci entraînerait une diminution de l'activité de l'eNOS (*Dimmeler et al. 2000; Fleming et al. 2003; Boo et al. 2002*).

Dans des cultures de cellules endothéliales non stimulées, la Ser 1177 n'est pas phosphorylée mais peut le devenir suite à une présence de forces de cisaillement, d'œstrogène, de VEGF, d'insuline ou de bradykinine (*Dimmeler et al. 1999 ; Lantierhermoso et al 1997 ; Kim et al. 2001*). En présence de forces de cisaillement, la phosphorylation de ce résidu se fait via l'Akt et la PKA (*Boo et al. 2002 ; Dimmeler et al. 1999*). L'œstrogène et le VEGF se fait principalement par Akt et l'insuline par l'Akt et l'AMPKA (*Fleming et al. 2001*). Lorsque la sérine est phosphorylée, la production de NO est augmentée de deux à trois fois par rapport au taux basal (*Mccabe et al. 2000*).

Le résidu Thr 495 est constitutivement phosphorylé dans les cellules endothéliales. Sa phosphorylation diminue l'activité de l'eNOS. La PKC phosphoryle le résidu Thr495 et la PP1 la déphosphoryle (*Fleming et al. 2003 ; Matsubara et al. 1996*). La stimulation des cellules endothéliales avec des facteurs de croissance tels que l'œstrogène stimule la phosphorylation du résidu Ser1177 et non pas celle du résidu Thr 495 (*Fleming et al. 2003*).

La synthèse du NO par les cellules endothéliales peut également être stimulée par de nombreux facteurs suite à la liaison au niveau de leurs récepteurs membranaires : les catécholamines (α_{1D} récepteur adrénergique), la thrombine (PAR-1 et PAR-2), l'œstradiol (ER α et ER β), l'histamine (récepteur H1), la sérotonine (récepteur 5-HT $_{1D}$), la bradykinine (récepteur B $_2$), l'angiotensine-II (AT $_2$), l'endothéline-1 (récepteur ET $_B$). Une fois stimulés, ces récepteurs entraînent une augmentation cytosolique de calcium. D'autres facteurs peuvent inhiber l'expression de la NOS endothéliale comme le TNF- α , l'hypoxie ou une concentration élevée de LDL oxydés (*Vanhoutte et al. 2008*).

Dans les cellules endothéliales, l'eNOS est retrouvée dans les cavéoles des membranes plasmiques et l'appareil de Golgi. Elle est inhibée par la présence de la cavéoline-1 qui empêche la liaison calcium-calmoduline (*Xu et al. 2008*). La cavéoline-1 est une protéine abondante dans les cellules endothéliales et se présente sous forme d'épingle. Lors de l'augmentation cytosolique de calcium, le complexe calcium/calmoduline se lie alors à l'eNOS (*Gratton et al. 2004*). Ceci permet la libération de l'eNOS de la cavéoline-1. L'eNOS peut alors se déplacer en dehors des cavéoles et synthétiser le NO. Une fois que le taux de calcium retrouve ses valeurs normales, l'eNOS retourne dans les cavéoles pour se lier à nouveau à la cavéoline-1 (*Sessa et al. 2005*). La protéine HSP tout comme le complexe calcium/calmoduline peuvent activer l'eNOS en la libérant de la cavéoline-1 (*Fleming et al. 1999 ; Gratton et al. 2004*).

L'induction de la relaxation des cellules musculaires lisses par le NO nécessite à la fois la présence de cofacteurs et la présence de réactions enzymatiques. Le NO se lie à la GC pour activer la conversion de GTP en GMPc. Cette transformation est dépendante de la présence de cations divalents : Mn^{2+} et Mg^{2+} (*Kazerounian et al. 2002*). Le GMPc peut alors réguler de nombreux facteurs comme des protéines kinases dépendantes de GMPc, des canaux ioniques dépendant du GMPc (*Grange et al. 2001 ; Lincoln et al. 1996*). La transduction du signal NO-GMPc est dépendante d'une protéine kinase G. Quand le taux de NO est élevé, la GTP est dégradée en GMPc. L'augmentation du GMPc intracellulaire diminue les concentrations calciques intracellulaires. Cette augmentation de GMPc active les canaux potassiques et entraîne une hyperpolarisation et ainsi une relaxation (*Sampson et al. 2001*). De plus, ceci stimule une protéine kinase dépendante de la GMPc qui active une phosphatase des chaînes légères de myosine qui

déphosphoryle les chaînes légères de myosine et induit une relaxation des cellules musculaires lisses (*Behrendt et al. 2002 ; Watanabe et al. 2000*).

1.3.1.4 Effets du NO

Le NO peut exercer de nombreux effets. Il est vasodilatateur et anti-thrombotique (inhibant l'adhésion des plaquettes). Il est aussi anti-inflammatoire en inhibant l'adhésion de leucocytes à l'endothélium et antiprolifératif (en inhibant l'hyperplasie des cellules musculaires lisses) (*Ait-Oufella et al. 2007*). Le NO antagonise les effets de l'endothéline-1 et inhibe les effets stimulateurs de croissance de l'épinephrine sur les cardiomyocytes (*Sanders et al. 2000 ; Hunter et al. 2009 ; Horinaka et al. 2006*)

Dans notre modèle d'hypertrophie ventriculaire gauche, Malo et al. (2003) ont observé une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium et une augmentation des vasoconstrictions et une diminution de la biodisponibilité du NO. Par contre, l'expression de l'eNOS fut maintenue. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la baisse des effets induits par le NO. Une baisse du recrutement des protéines HSP, une baisse de la biodisponibilité de la L-arginine ou de la BH4 peuvent ainsi découpler l'eNOS et ainsi stimuler la production de l'anion superoxyde (*Beyers et al. 2006*). Les ERO dérivant de la xanthine oxydase et de la NADPH oxydase peuvent aussi contribuer à l'inactivation du NO et favoriser le remodelage cardiaque (*Murdoch et al. 2006 ; George et al. 2009*). L'eNOS peut donc être un médiateur à double face puisqu'elle peut avoir un effet anti-hypertrophique et antioxydant, mais une fois découplée elle devient productrice d'ERO et contribue ainsi au développement de maladies cardiovasculaires (*Beyers et al. 2006*). Ceci se produit lorsque le flux

d'électrons allant dans le domaine réductase du NADPH vers la terminaison aminale de l'hème de l'oxydase est perturbé. Ceci entraîne une diminution de la synthèse de NO et favorise la production de l'anion superoxyde par dissociation du complexe fer-dioxygène.

1.3.2 Prostacycline

La prostacycline, découverte dans les années 70, appartient à la famille des prostaglandines et est un dérivé de l'acide arachidonique (*Vane et al. 1995*). La cyclooxygénase-II métabolise l'acide arachidonique en prostaglandine H₂. Cette dernière est alors transformée en prostacycline par l'intermédiaire de la prostacycline synthase. La synthèse de la prostacycline peut être stimulée par les forces de cisaillement, par l'ATP et les acides gras monohydroxylés (*Wise et al. 1996*).

L'effet de la prostacycline est induit par l'intermédiaire d'un récepteur IP couplé à une protéine G α s hétérotrimérique qui est présente au niveau des cellules musculaires lisses et des plaquettes (*Gleim et al. 2009*). Une fois le récepteur activé, celui-ci entraîne une activation de l'adénylate cyclase qui entraîne une accumulation d'adénosine monophosphate cyclique qui stimule l'activation de la protéine kinase A (PKA). Cette PKA inhibe la phosphorylation de la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK) et ainsi entraîne une relaxation (*Arehart et al. 2007*). Il a été suggéré que ce même récepteur peut interagir avec la protéine G α q pour mobiliser le calcium intracellulaire mais ceci reste à être confirmé dans les cellules musculaires lisses (*Fetalvero et al. 2006* ; *Gomberg-Maitland et al. 2005*).

La prostacycline essentiellement synthétisée par les cellules endothéliales est vasodilatatrice, anti-thrombotique et anti-inflammatoire. Elle agit synergiquement avec le

NO pour inhiber l'agrégation plaquettaire. De plus, elle empêche la croissance des fibroblastes et stimule l'apoptose (*Fetalvero et al. 2007*).

Il a été démontré qu'un équilibre entre la prostacycline et la thromboxane A₂ était un facteur déterminant dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire (*Fetalvero et al. 2006*). La thromboxane A₂, vasoconstricte et libérée par les plaquettes, est un produit du métabolisme de l'acide arachidonique induite par la cyclooxygénase-1. Elle induit son effet en se liant au récepteur TP. Il a été démontré chez des souris ayant les deux gènes pour les récepteurs de la prostacycline et de la thromboxane invalidés, que la prostacycline peut moduler l'homéostasie cardiovasculaire en modulant les effets induits par la thromboxane (*Gleim et al. 2009*). De plus, des souris ayant le gène invalidé pour le récepteur de la prostacycline (-/-) ont une prolifération intinale augmentée par rapport à des souris sauvages. Ceci peut être expliqué par une augmentation de l'activation plaquettaire. Cet effet peut être renversé en invalidant le gène TP (*Cheng et al. 2002*).

Il a été démontré qu'une inhibition de la COX-2 entraîne une baisse de la synthèse de la prostacycline sans atténuer celle de la thromboxane. Ces résultats ont permis de postuler que les inhibiteurs de la COX-2 déplaçaient l'équilibre homéostatique cardiovasculaire en faveur de la thromboxane A₂, ce qui favorise le développement de thrombose, d'athérosclérose et d'hypertension chez des personnes prédisposées à développer des maladies cardiovasculaires (*Fetalvero et al. 2007 ; Blank et al. 1990*).

La stimulation du récepteur IP inhibe la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses. La prostacycline pourrait aussi protéger le système vasculaire en maintenant les cellules musculaires lisses dans un état différencié en activant une série de

gènes SM-spécifiques qui entraîne le phénotype contractile. Ceci permettrait de prévenir la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (*Fetalvero et al. 2007*).

La prostacycline peut inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses in vitro et in vivo en inhibant le passage des cellules en phase G1 en phase S (*Kothapalli et al. 2005*). Cet effet serait induit par l'inhibition de l'inhibiteur de la protéine kinase cycline-dépendante p27kip. De plus, la prostacycline peut aussi inhiber la migration cellulaire en hypophosphorylant une kinase d'adhésion focale (*Kothapalli et al. 2005 ; Stewart et al. 2004*).

1.3.3 EDHF

Un autre facteur vasodilatateur synthétisé par l'endothélium est le facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF) qui est surtout présent au niveau des petites artères et artérioles. Il est responsable de la vasodilatation lorsque l'activité du NO et de la prostacycline sont inhibées ou réduites au niveau de micro-vaisseaux. L'identité actuelle de l'EDHF reste inconnue : de fait, elle semble varier selon l'espèce, le lit vasculaire, et l'état pathologique/physiologique. Toutefois peu importent les conditions, il en résulte une hyperpolarisation; celle-ci peut-être le résultat de l'action d'un seul facteur ou de la combinaison de plusieurs facteurs diffusibles et non diffusibles. Pour le rôle de facteur diffusible, les ions potassiques (*Edwards et al. 1998*), l'acide epoxyeicosatriénoïque (EET), le peroxyde d'hydrogène (*Hamilton et al. 2001*), le peptide natriurétique de type C (CNP) (*Chauhan et al. 2004*) ont été proposés. Concernant le mécanisme, l'hyperpolarisation via les jonctions intercellulaires a été avancée (*Campbell et al. 2001*). Peu importe le mécanisme impliqué, l'augmentation intracellulaire de calcium est à l'origine de l'hyperpolarisation et ainsi de la vasorelaxation induite au niveau des cellules

musculaires lisses (*Félétou et al. 2009*). Plus précisément, ces ions activent les canaux potassiques endothéliaux sensibles au calcium et génèrent une hyperpolarisation endothéliale (*Bolton et al. 2002*). Certaines études ont démontré qu'il s'en suivait un efflux d'ions potassiques dans l'espace myoendothélial, en augmentant ainsi la concentration extracellulaire de potassium de 3 à 8 mmol/L (*Parkington et al. 2008 ; Busse et al. 2002*). Subséquemment, l'augmentation de potassium intracellulaire est à l'origine d'une hyperpolarisation et donc, d'une vasorelaxation des cellules musculaires lisses par l'intermédiaire de canaux potassiques rectifiant entrant et la pompe Na^+/K^+ (*Campbell et al. 2001 ; Fleming et al. 2000 ; Chilian et al. 2001*).

1.4 Facteurs contractant dérivés de l'endothélium

L'endothélium peut aussi induire une vasoconstriction des cellules musculaires lisses par la libération de facteurs contractants dérivant de l'endothélium (EDCF). En voici quelques exemples : l'endothéline-1, l'angiotensine II, le thromboxane A_2 et la prostacycline.

1.4.1 Endothéline-1

La préproET-1 est un précurseur inactif de l'endothéline-1 qui est d'abord clivé sous forme d'un peptide inactif de 38 acides aminés et qui est ensuite clivé en un peptide de 21 acides aminés qui est la forme active de l'endothéline. L'endothéline-1 est le plus puissant vasoconstricteur connu et se lie à deux récepteurs couplés à des protéines G : ET_a et ET_b (*Peltonen et al. 2009*). Ces deux récepteurs sont situés sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et sur les fibroblastes. Le récepteur ET_b endothélial peut induire une relaxation dépendante de l'endothélium induite par la libération de NO (*Bohm et al. 2007*). Les récepteurs ET_b et ET_a des cellules musculaires

lisses et des fibroblastes peuvent stimuler la formation de fibrose, la vasoconstriction et la prolifération cellulaire (*Kedzierski et al. 2001*).

Dans certaines conditions pathologiques, l'endothéline-1 peut entraîner une surexpression de la cavéoline-1 et ainsi inhiber l'activité de l'eNOS. Dans des cultures de veines saphènes humaines, il a été démontré que l'endothéline-1 peut diminuer la synthèse de NO en favorisant la liaison de l'eNOS à la cavéoline-1 (*Ramzy et al. 2006*). De plus, en inhibant les deux récepteurs ET_b et ET_a, l'activité de l'eNOS fut maintenue et la production de NO ne fut pas altérée par la présence de l'endothéline-1 (*Kamoun et al. 2006 ; Iglarz et al. 2001*).

L'endothéline-1 peut aussi augmenter la dégradation du NO. Il a été démontré *in vivo* chez des souris qu'une surexpression d'endothéline-1 était associée à une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium induites par le NO et à une augmentation d'ERO (*Amiri et al. 2004*). Les deux récepteurs peuvent augmenter la production d'ERO. La BH₄, un cofacteur de l'eNOS, semble être une cible des ERO. Lorsque la BH₄ est oxydée, elle entraîne le découplage de l'eNOS (*Channon et al. 2004*). Il a été démontré qu'une supplémentation en BH₄ pouvait inhiber la production d'ERO induite par l'endothéline-1 dans l'aorte intacte. Ceci ne fut pas observé dans l'aorte intacte, ce qui confirme que l'endothéline-1 diminue la biodisponibilité du BH₄ et ainsi entraîne l'apparition d'une dysfonction endothéliale par l'augmentation de la présence d'ERO (*Loomis et al. 2005*).

Il a été démontré que l'endothéline-1 pouvait interagir avec l'angiotensine-II. L'angiotensine peut stimuler la synthèse d'endothéline-1 dans les cellules endothéliales et

dans les cellules musculaires lisses *in vivo*. Une infusion d'angiotensine-II chez des souris mène au développement d'hypertension. Cette pathologie peut être prévenue en administrant des antagonistes des récepteurs ET_a et ET_b (*Pollock et al. 2005 ; d'Uscio et al. 1998*).

1.4.1 Angiotensine-II

L'angiotensine-II, un octapeptide provenant du clivage de l'angiotensine-I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine, peut exercer différents effets sur les cellules endothéliales via ses différents types de récepteurs. Les récepteurs AT-1 et AT-2 ont tous deux été impliqués dans l'apoptose des cellules endothéliales (*Yamamoto et al. 2008 ; Diep et al. 2002*). L'angiotensine-II augmente l'activité de la NADPH oxydase dans les cellules endothéliales, ce qui entraîne une augmentation de la production de l'anion superoxyde via les deux récepteurs AT-1 et AT-2. L'angiotensine-II et l'anion superoxyde stimulent aussi l'apoptose en inhibant le facteur anti-apoptotique Bcl2, en bloquant la transcription de son gène et augmentant la synthèse du facteur pro-apoptotique Bax (*Liu et al. 2009*). De plus, elle peut inactiver ERK1/2 et stimuler la MAPK phosphatase 3 et ainsi inhiber Bcl2 (*Dimmeler et al. 2000*). Le récepteur AT-1 peut diminuer l'activité de l'eNOS en se liant à elle. Cette enzyme peut aussi être inhibée par l'activation des récepteur B₂ et le récepteur ET-1. De plus, il a été démontré que l'angiotensine-II peut inhiber l'apoptose de cellules endothéliales microvasculaires en activant la phosphatidylinositol 3-kinase et l'Akt qui stimule l'activité de la survivine qui est une protéine anti-apoptotique (*Ohashi et al. 2004*).

La COX-2 peut être stimulée par l'angiotensine-II et la thromboxane A₂. La stimulation de la COX-2 via l'angiotensine-II peut promouvoir le développement d'une

dysfonction endothéliale (Morinelli et al. 2008 ; *Félléto* et al. 2010). Dans les cellules endothéliales aortiques de rats spontanément hypertendus, la COX-2 produit des prostanoides contractants comme la thromboxane A₂ et la prostaglandine E₂ et est donc une source de stress oxydant (*Félléto* et al. 2009). L'angiotensine-II peut augmenter la synthèse de VEGF via le récepteur AT-1 dans les cellules endothéliales et stimuler l'angiogénèse via la COX-2. Cette augmentation de VEGF est accompagnée d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la formation d'œdèmes (*Tamarat et al. 2002 ; Page et al. 2002*).

Le récepteur AT-2 joue un rôle important dans le système cardiovasculaire. Il a été démontré que le récepteur AT-2 peut protéger les souris contre l'ischémie cérébrale et myocardique, également démontré chez des souris ayant le gène pour le récepteur AT-2 invalidé (*Steckelings et al. 2010 ; Lemarie et al. 2010*). Cette protection se ferait via un système qui couple le NO/la bradykinine et le GMPc. La stimulation de l'AT-2 inhibe l'échangeur Na⁺/H⁺ et entraîne donc une acidification du milieu intracellulaire. Ceci active une kininogénase qui augmente la production de la bradykinine qui se lie sur son récepteur B₂ situé sur les cellules musculaires lisses et sur les cellules endothéliales (*Reudelhuber et al. 2007*). La bradykinine stimule l'eNOS et le NO stimule la relaxation de cellules musculaires lisses. La bradykinine stimule aussi la dismutase du superoxyde extracellulaire qui diminue la production de l'anion superoxyde et ainsi augmente la biodisponibilité du NO (*Tsutsumi et al. 1999 ; Watanabe et al. 2005*). De plus, l'angiotensine II peut réguler l'expression de l'eNOS tandis que le NO peut contrôler l'activité du récepteur AT-2. Par contre dans les cellules musculaires lisses, il a été démontré que le NO empêchait la liaison de l'angiotensine II était expliqué par une baisse

l'expression de l'ARNm du récepteur AT-1 (*Reudelhuber et al. 2007*). L'angiotensine II peut aussi exercer un effet inhibiteur contre l'accumulation du GMPc induite par des donneurs de NO en stimulant l'activité et l'expression des phosphodiesterases 1 et 5 qui hydrolysent le GMPc dans les cellules musculaires lisses et dans les vaisseaux (*Kass et al. 2007*). Le peptide atrial natriurétique peut aussi inhiber la production de GMPc dans les cellules musculaires lisses et dans les vaisseaux. Le mécanisme de signalisation de ce récepteur reste inconnu (*Molina et al. 1987 ; Watanabe et al. 2005*).

1.4.2 Thromboxane A₂

La COX transforme l'acide arachidonique en prostaglandine PGH₂ (ou endoperoxyde). Cette dernière est alors transformée en thromboxane A₂ par l'intermédiaire de la thromboxane A₂ (*Félétou et al. 2010*). Une fois synthétisée, la thromboxane A₂ se lie à un récepteur TP. Une fois le récepteur stimulé, ceci entraîne une entrée de calcium via des récepteurs, des canaux calciques voltage-dépendant et via une sensibilisation des myofilaments par l'intermédiaire de la Rho-kinase (*Song et al. 2009*). La thromboxane A₂ stimule l'agrégation plaquettaire, exprime des molécules adhésives, favorise l'adhésion et l'infiltration de monocytes et de macrophages et neutralise le NO. D'autres prostaglandines peuvent se lier au récepteur TP. L'expression de ce récepteur est augmentée dans plusieurs pathologies telles que l'hypertension et le diabète (*Liu et al. 2009; Félétou et al. 2010 ; Auch-Schwelk et al. 1990*).

1.4.3 Prostacycline

Dans les cellules endothéliales, le gène de la prostacycline synthase est celui le plus exprimé (*Vanhoutte et al. 2008*). Il est encore plus fortement exprimé dans les rats spontanément hypertendus (SHR). Son expression augmente avec l'âge et avec la présence d'hypertension (*Numaguchi et al. 1999*). Dans les rats SHR, l'acétylcholine

libère une plus grande quantité de prostacycline dans l'aorte par rapport aux rats de type sauvage. Dans les rats hypertendus et les rats plus âgés, la prostacycline induit une forte contraction au lieu d'induire une relaxation. La prostacycline se lie au récepteur TP chez les rats SHR entraînant ainsi une augmentation de la concentration du calcium cytosolique suivi d'une contraction des cellules musculaires lisses. Le récepteur IP est non fonctionnel dans les cellules musculaires lisses mais il est toujours actif sur les plaquettes (*Félétou et al. 2009*). Il est maintenant admis que chez les rats SHR, les endoperoxydes et la prostacycline sont les principaux médiateurs de contractions dépendantes de l'endothélium (*Vanhoutte et al. 2008*).

1.5 Stress oxydant

Plusieurs études suggèrent que le stress oxydant serait impliqué dans le développement et la progression de nombreuses pathologies comme l'hyperlipidémie, le diabète, le vieillissement, l'hyperhomocystéinémie (*Lakshmi et al. 2009*). Ces conditions pathologiques sont toutes associées à un risque accru de développement de maladies cardiovasculaires (telles que l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque) et sont liées au développement d'une dysfonction endothéliale vasculaire (*Higashi et al. 2009*). Cette dernière se manifeste par une baisse de la synthèse de médiateurs vasodilatateurs et/ou une augmentation de la synthèse (ou une augmentation de la sensibilité des cellules musculaires lisses) des vasoconstricteurs endothéliaux (*Higashi et al. 2009*).

1.5.1 Espèces réactives oxygénées (ERO)

Depuis plusieurs années, les espèces réactives oxygénées sont considérées comme étant délétères car elles induisent des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines (*Halliwell et al. 2007*). Les ERO sont des molécules à base d'oxygène qui sont très réactives chimiquement et sont générées par tout organisme aérobie. À l'équilibre, les

taux d'ERO sont contrebalancés par des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques qui permettent des concentrations relativement faibles et ainsi une homéostasie (*Johansen et al. 2005*). Une perturbation de cet équilibre due à une augmentation d'ERO et/ou une baisse des réserves antioxydantes se traduit par un état de stress oxydant (*Halliwell et al. 2007*).

Il existe deux classes d'ERO : les radicaux libres (anion superoxyde et l'ion peroxynitrite) et les espèces non radicalaires (comme le peroxyde d'hydrogène). Ces dernières sont caractérisées par une haute instabilité.

1.5.1.2 Anion superoxyde

Au pH physiologique, cette molécule est à la fois un radical libre (à cause de son électron non couplé) et un anion. Sa charge négative lui permet de traverser les membranes cellulaires via des canaux anioniques (*Fridovich et al. 1983*). Cette ERO est synthétisée principalement par le complexe III de la mitochondrie dans le cœur. Ces ERO sont produits par les NADPH oxydases dans les neutrophiles, les cellules endothéliales et les macrophages (*Bayir et al. 2008*). Cette enzyme permet le transfert d'un électron du NADPH vers une molécule d'oxygène qui se transforme alors en anion superoxyde (*Griendling et al. 2000*). En condition normale, l'anion superoxyde se transforme rapidement en peroxyde d'hydrogène via la superoxyde dismutase (voir figure 3). Il peut aussi se transformer en peroxynitrite par l'intermédiaire d'une interaction avec le NO dans certaines conditions pathologiques présentant un stress oxydant tel que dans notre modèle d'HVG. L'anion superoxyde est le précurseur des autres ERO (*Wolin et al. 2002*).

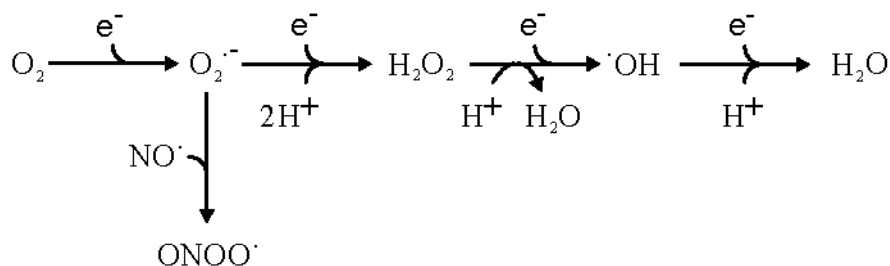


Figure 2. Transformation de l'anion superoxyde en eau.

O_2 : oxygène; $\text{O}_2^{\cdot-}$: anion superoxyde; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; H_2O : eau ;

e^- : électron ; NO : monoxyde d'azote ; H^+ : proton ; $\text{ONOO}^{\cdot-}$: ion peroxynitrite.

1.5.1.3 Ion peroxynitrite

L'ion peroxynitrite $\text{ONOO}^{\cdot-}$ est un oxydant important formé par une réaction bimoléculaire du NO avec l'anion superoxyde. La formation d' $\text{ONOO}^{\cdot-}$ dépend donc du taux de formation de NO et de l'anion superoxyde (voir figure 3) (Heeba *et al.* 2007). Cette transformation de l'anion superoxyde est trois fois plus rapide que la dismutation de cet anion par la dismutase du superoxyde. L'ion peroxynitrite a une demi-vie de 10 ms (Pacher *et al.* 2007 ; Hulvey *et al.* 2010). Ceci est dû à la catalyse de protons décomposés et d'autres réactions moléculaires. Plusieurs molécules sont oxydées par des radicaux dérivant du peroxynitrite : les thiols, l'ADN et les phospholipides (Szabo *et al.* 2007). Le peroxynitrite oxyde les thiols en mobilisant un seul de leurs électrons (Quijano *et al.* 1997). Les composés thiols sont donc amenés à des états d'oxydations plus élevés et forment des dérivés sulphonique et sulphonique (Bonini *et al.* 2001). Les purines et les désoxyriboses peuvent être oxydés par l'ion peroxynitrite. Cet ion peut aussi favoriser les cassures d'ADN. L'ion peroxynitrite favorise la peroxydation des lipides et la formation

de composés nitroperoxydés. Ces derniers favorisent une inhibition des processus inflammatoires via les voies dépendantes et indépendantes PPAR- γ (*Wright et al. 2006*). L'ion peroxynitrite peut aussi oxyder la BH₄ et entraîner ainsi le découplage de l'eNOS (*Wolin et al. 2002*).

1.5.1.4 Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est une ERO qui provient de la transformation de l'anion superoxyde par la dismutase du superoxyde (voir figure 3). Il n'est pas chargé comme l'anion superoxyde ou le peroxynitrite. La catalase et la peroxidase de glutathion sont des enzymes qui neutralisent le peroxyde d'hydrogène et le transforme en eau (*Wolin et al. 2009*). Le peroxyde d'hydrogène exerce de nombreux effets. Selon le lit vasculaire, les conditions expérimentales et les concentrations, le peroxyde d'hydrogène peut présenter des propriétés vasodilatatrices ou vasoconstrictrices et peut dépolariser ou hyperpolariser les cellules musculaires lisses (*Ellis et al. 2003*). Dans l'artère mésentérique murine isolée, le peroxyde d'hydrogène produit une relaxation dépendante de l'endothélium (si les canaux K_{ca} sont fonctionnels) mais peuvent à la même concentration de 50 $\mu\text{mol/L}$ entraîner une contraction si ces canaux K_{ca} sont non fonctionnels (*Féléto et al. 2009*). Il stimule la migration de plusieurs types de cellules (macrophages et cellules musculaires lisses). Il favorise le dépôt de collagène par les myofibroblastes et stimule le fibrinogène (*Rojkind et al. 2002 ; Greenwel et al. 2000*).

1.5.2 Sources endothéliales

Les deux catégories d'ERO sont formées par les enzymes pro-oxydantes incluant : la NADPH oxydase, la mitochondrie de la chaîne respiratoire, le cytochrome P450, la xanthine oxydase/réductase et l'eNOS (*Wolin et al. 2002*).

1.5.2.1 NADPH oxydase

Les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes possèdent des oxydases ayant des sous-unités ressemblant à la NADPH oxydase phagocytaire (*Wolin et al. 2002*). Cette oxydase transfère des électrons du NADPH vers des sites flaviniques qui réduisent un cytochrome de sous-type b-558 (*Griendling et al. 2000*). Ce cytochrome réduit réagit alors avec une molécule d'oxygène afin de produire un anion superoxyde. Les deux sous-unités p22phox et gp91phox sont responsables de la synthèse de l'anion superoxyde. Il existe 5 isoformes de la gp91phox. Au niveau vasculaire, on retrouve NOX1, NOX 4 et gp91phox (*Ray et al. 2005*). Les quatre sous-unités formant la NADPH oxydase vasculaire sont la gp91phox, la p22phox, la p47phox et la p67phox (*Akki et al. 2009*). Plusieurs études ont démontré que le récepteur AT1 stimulait l'expression et l'activité de la NADPH oxydase dans différentes pathologies cardiovasculaires telle que l'hypertension artérielle (*Lassegue et al. 2001 ; Pendergrass et al. 2009*).

1.5.2.2 Mitochondrie

La mitochondrie produit une quantité significative d'ERO. L'anion superoxyde est produit lors des transports d'électrons dans la synthèse d'ATP. En conditions normales, jusqu'à 2% de molécules d'oxygène sont consommées pour être converties en anions superoxydes (*Wolin et al. 2002*). Ce pourcentage est alors augmenté en présence de certains facteurs ou stimuli. La formation d'ERO par la mitochondrie stimule l'activation de la NADPH oxydase (boucle de rétroaction positive) (*Tsai et al. 2010*). La formation d'ERO peut être augmentée suite à la mort de la cellule endothéliale due à un détachement cellulaire ou à l'effet de cytokines comme le TNF- α (*Wolin et al. 2002*). L'hypoxie et l'hyperoxie sont aussi des stimulateurs de la production mitochondriale

d'EROS (*Weir et al. 1995*). Les ERO mitochondriales ont aussi un rôle dans la réponse inflammatoire des cellules endothéliales en réponse aux forces de cisaillement. Une augmentation mitochondriale de la production de l'anion superoxyde suite à une hyperglycémie peut activer les voies biochimiques et pro-inflammatoires qui sont associées aux complications vasculaires du diabète. La normalisation du taux d'ERO mitochondriale empêche des dommages hyperglycémiques aux cellules endothéliales vasculaires (*King et al. 2004*). Peu d'études ont démontré que la mitochondrie était une source d'ERO dans les tissus vasculaires en condition normale. Par contre, des signaux apoptotiques peuvent stimuler la production d'un haut taux de produits oxydés dérivant de la mitochondrie (*von Harsdorf et al. 1999*).

1.5.2.3 Cytochrome P450

Le cytochrome P450 peut oxyder plusieurs substrats à l'aide de cofacteurs comme la NADPH oxydase ou des molécules d'oxygène et peut donc synthétiser des ERO comme l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène (*Lakshmi et al. 2009*). Le CYP2 est un exemple de cytochrome et est exprimé dans les cellules endothéliales et convertit l'acide arachidonique en acide epoxyeicosatricoïque (molécule qui possède des propriétés vasodilatatrices) (*Fleming et al. 2001*). Des études ont démontré que le CYP2 pouvait aussi synthétiser des ERO dans les cellules endothéliales. Étant donné que le CYP2 synthétise à la fois des vasodilatateurs et des vasoconstricteurs, son effet bénéfique pour la cellule endothéliale reste toujours une controverse (*Nayeem et al. 2008*). Une étude a démontré que le CYP2 nuit aux relaxations induites par l'endothélium et stimule l'expression de molécules d'adhésions leucocytaires sur les cellules endothéliales (*Li et al. 1999*) (*Pagano et al. 2004*) (*Wolin et al. 2002*).

1.5.2.4 Xanthine oxydase/déshydrogénase

La majorité de l'endothélium vasculaire présente une xanthine déshydrogénase ayant une xanthine oxydase qui est peu active. L'activité de la xanthine oxydase peut être augmentée par l'oxydation de groupements thiols. Cette dernière oxyde l'hypoxanthine en xanthine et par la suite en acide urique et en peroxyde d'hydrogène. La xanthine déshydrogénase transforme la xanthine en urate en présence de deux cofacteurs tels que le NAD⁺ et l'eau (*Pacher et al. 2006*). L'activité de la xanthine oxydase est augmentée dans des cellules endothéliales vasculaires de rats exposées à une période d'ischémie/reperfusion. De plus, la xanthine oxydase peut stimuler la synthèse de l'anion superoxyde en stimulant la NADPH oxydase dans des cellules endothéliales vasculaires de rats (*Wolin et al. 2002; Berry et al. 2004 ; Higgins et al. 2009*).

1.5.2.5 eNOS

Plusieurs études ont démontré que l'eNOS pouvait être une source d'ERO. Une baisse de L-arginine ou une oxydation ou une déplétion de la BH4 peut entraîner un découplage de l'eNOS et ainsi favoriser la production d'anion superoxyde (*Topal et al. 2004 ; Bevers et al. 2006*).

1.5.3 Enzymes antioxydantes

Les antioxydants régulent à la fois la quantité d'ERO libérées mais aussi régulent leur compartimentalisation. Il existe plusieurs systèmes enzymatiques comme la dismutase du superoxyde (SOD), la peroxydase du glutathion et la catalase.

1.5.2.1 Dismutase du superoxyde (SOD)

Il existe trois isoformes de la superoxyde dismutase : la CuZnSOD, la MnSOD et la SOD extracellulaire. La SOD qui prédomine dans les cellules endothéliales est celle à cuivre zinc (CuZnSOD) (*Faraci et al. 2004*). La MnSOD se retrouve dans les

mitochondries. La SOD extracellulaire est située sur la membrane plasmique et est sécrétée par les cellules musculaires lisses (*Muzykantov et al. 2001*). La MnSOD et la forme extracellulaire inhibent la formation de l'anion superoxyde dans des modèles d'hypertension et de diabète. La CuZnSOD est la forme dominante dans les vaisseaux sanguins et représente 50 à 80% de l'activité totale de la SOD. Une déficience de cette enzyme entraîne une augmentation de la production de l'anion superoxyde et l'ion peroxynitrite et diminue les relaxations dépendantes de l'endothélium dans des artères et dans les micro-vaisseaux. Les trois enzymes transforment l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (voir figure 4) (*Chen et al. 2006 ; Faraci et al. 2004 ; Balaban et al. 2005*).

1.5.2.2 Peroxydase du glutathion

La peroxydase de glutathion est une enzyme qui est formée de quatre sous-unités dont chacune contient un atome de sélénium. Elle permet de coupler deux réactions à la fois : la réduction du peroxyde d'hydrogène et l'oxydation du glutathion. Le peroxyde d'hydrogène est alors transformé en eau et oxygène (*Margis et al. 2008*). Le glutathion est oxydé en glutathion dissulfide. Ce dernier peut être de nouveau transformé en glutathion réduit par l'intermédiaire de la glutathion réductase qui couple cette réaction à l'oxydation du NADPH qui provient du cycle des pentoses (voir figure 4). Il est fort probable que le peroxyde d'hydrogène extracellulaire et cytosolique est préférentiellement réduit par le glutathion et la peroxydase de glutathion (*Suttorp et al. 1986; Oshino et al. 1977*). Il existe trois isoformes de la peroxydase de glutathion dont la GPx-1 est la plus courante (*Brosnan et al. 2008*). 70% du peroxyde d'hydrogène synthétisé par les leucocytes polymorphonucléaires activés par les cellules endothéliales vasculaires bovines sont détoxifiés par la GPx-1 (*Dobrina et al. 1986*). Chrissobolis et al.

(2008) ont démontré dans des carotides de souris ayant le gène pour la GPx-1 invalidé (homozygote GPx1^{-/-} et hétérozygote GPx^{-/+}) que les relaxations induites par l'acétylcholine étaient diminuées. Par contre, les souris ayant une surexpression du gène GPx-1 démontrent une nette amélioration des relaxations endothéliales induites par l'acétylcholine. Hamanishi et al. (2004) ont démontré que des mutations dans le promoteur du gène GPx-1 peuvent augmenter l'épaisseur de l'intima/média des artères carotidiennes de patients atteints de maladies cardiovasculaires. On peut donc constater que des modifications de l'expression de la GPx-1 peuvent provoquer des modifications de la fonction vasculaire.

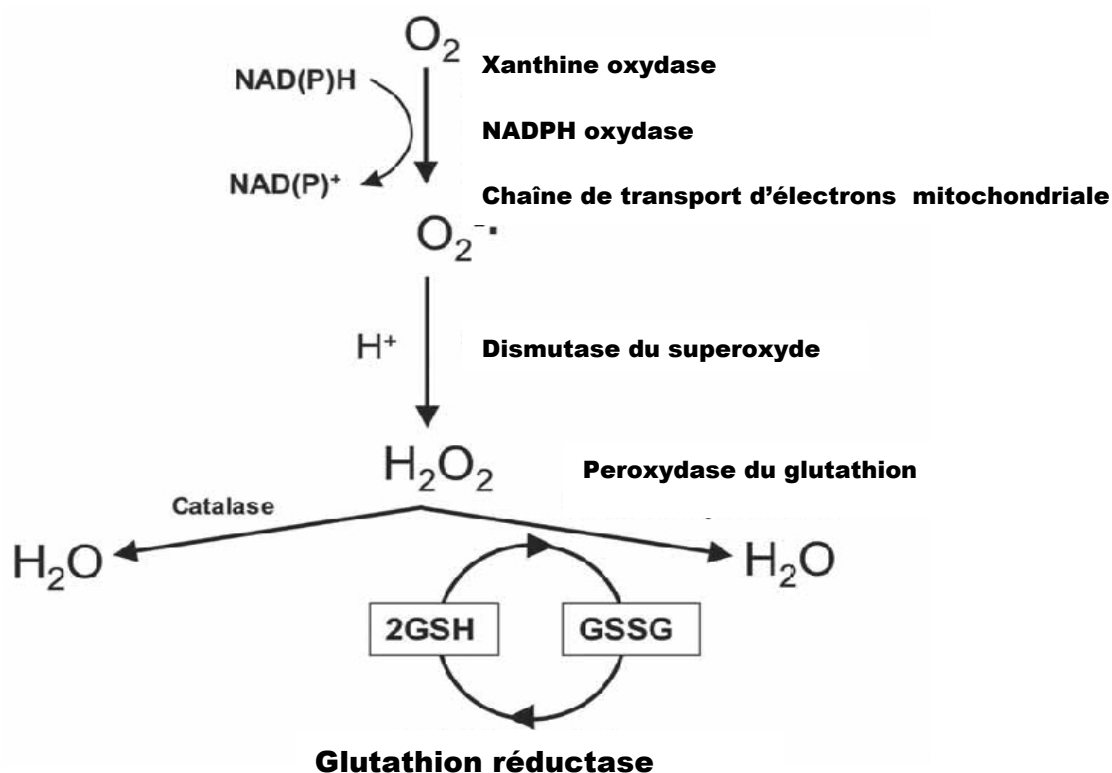


Figure 3. Dégradation de l'anion superoxyde.

O_2 : oxygène ; $O_2^{\cdot -}$: anion superoxyde; H^+ : proton ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; H_2O : eau ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; NADPH : nicotinamide

adénine dinucléotide phosphate (forme réduite) ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

1.5.2.3 Catalase

C'est une enzyme formée d'une protéine tétramère qui contient un hème. Elle transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (voir figure 4). Elle peut inhiber la peroxydation des lipides et l'adhésion leucocytaire lorsqu'elle est administrée avec la SOD (*Muzykantov et al. 2001, Alfonso-Prieto 2009*).

1.6 Hypertrophie ventriculaire gauche (HVG)

L'HVG est caractérisée par un épaississement de la paroi du ventricule gauche. L'hypertension, un infarctus du myocarde, une cardiomyopathie dilatée, une sténose ou une régurgitation de la valve aortique sont toutes des maladies qui peuvent causer l'HVG. Cette pathologie se développe suite à une surcharge de pression ou de volume (*Bauml et al. 2010*). Une surcharge de volume entraîne une augmentation du nombre de sarcomères. Ceci induit une croissance du diamètre de la cavité ventriculaire et une montée de la tension de la paroi ventriculaire (conséquence de la loi de Laplace). Cette augmentation de la tension entraîne une augmentation du nombre de sarcomères en parallèle (*Topol 2005*). Ce remodelage cardiaque permet de distribuer la tension sur une plus grande surface ventriculaire et donc de ramener à la normale la tension exercée sur chaque fibre musculaire. Ces augmentations de diamètre et d'épaississement caractérisent l'hypertrophie excentrique. La surcharge de pression induit une augmentation de la pression pariétale par l'intermédiaire d'une augmentation de la pression intraventriculaire et entraîne une augmentation du nombre de sarcomères en parallèle. L'augmentation de la

pression entraîne donc une hypertrophie concentrique c'est-à-dire un épaississement de la paroi sans augmentation du diamètre de la cavité ventriculaire (*Hall 2005*).

Ces deux types d'hypertrophie sont initialement compensatoires et donc bénéfiques. L'hypertrophie permet une augmentation du débit systolique sans une augmentation de l'état inotropique du myocarde. Ceci permet une adaptation efficace à la surcharge de volume et un maintien du débit systolique et du débit cardiaque en présence d'une baisse de la contractilité du cœur (*Hall 2005*). L'hypertrophie musculaire permet donc un retour à la normale de la tension par unité muscle/fibre et diminue ainsi le stress ventriculaire. Si les facteurs stimulant l'HVG persistent, l'HVG devient maladaptative. L'HVG est associée à des effets délétères pour le myocarde. Lors des premiers stades de formation de l'HVG, on peut observer des taux anormaux de calcium cellulaire qui sont responsables des perturbations de la relaxation ventriculaire. Cet effet combiné à une baisse de la compliance passive d'un myocarde plus épais, précipite et contribue au développement d'une dysfonction diastolique. Une baisse de la densité des capillaires, une baisse de la réserve coronarienne et une relaxation anormale sont tous des facteurs qui peuvent contribuer à une baisse de la perfusion sous-endocardique et donc entraîner une ischémie de cette zone (*Butler 2002*). La coexistence d'une cardiopathie ischémique pourrait promouvoir le développement de l'HVG. Il peut aussi se former de la fibrose interstitielle cardiaque. Cette formation de fibrose est plutôt observée dans un modèle de surcharge de pression. Dans les stades plus avancés de surcharge chronique, une augmentation du stress oxydant peut être détectée. Ce stress peut causer de très grandes perturbations cellulaires. Tous ces phénomènes peuvent entraîner une apoptose, une formation de fibrose, une insuffisance cardiaque et la mort (*Cohen et al. 2002*).

Pour détecter la présence d'une HVG, les médecins peuvent faire des électrocardiogrammes, des images à résonances magnétiques ou des échographies. L'échographie reste la méthode de choix pour les cardiologues. Elle permet d'estimer le volume et la masse du ventricule gauche. Les traitements actuels pour cette pathologie sont la médication ou la chirurgie. Une HVG due à une hypertension sera traitée par une administration de médicaments antihypertenseurs comme par exemple les diurétiques, les bêta-bloqueurs, les bloqueurs des canaux calciques ou les inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Les patients atteints de sténose aortique, peuvent subir une chirurgie leur permettant de remplacer leur valve aortique par une valve artificielle ou une valve porcine. Les médecins peuvent aussi avoir recours à la chirurgie pour traiter la régurgitation aortique (*Vacheron et al. 1992*).

Plusieurs études précliniques ont démontré que les ERO participent au remodelage cardiaque, à la croissance des cellules myocardiques et au développement des dysfonctions endothéliales (*Paravicini et al. 2008*). Elles stimulent le développement de l'hypertrophie des cardiomyocytes via la stimulation de facteurs de transcription et de kinases. Le peroxyde d'hydrogène peut stimuler des protéines impliquées dans l'apoptose comme la tyrosine kinase Src, la protéine Ras et la protéine kinase C (une protéine kinase activée par mitogène) chez des cardiomyocytes de rats néonataux (*Wei et al. 2001; Sabri et al. 2002; Takimoto et al. 2007*).

Les ERO peuvent stimuler l'hypertrophie cardiaque induite par les protéines G via la stimulation de l'angiotensine-II qui se lie aux récepteurs AT-1 ou AT-2 qui sont exprimés tous deux dans le muscle cardiaque et dans les cardiomyocytes isolés. En condition normale, les fibroblastes cardiaques n'expriment que les AT-1 mais peuvent

réactiver les AT-2 en présence d'une insuffisance cardiaque. L'augmentation de la concentration de l'angiotensine-II stimule l'augmentation de l'expression des composants du système rénine-angiotensine : l'angiotensinogène, la rénine, l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les récepteurs AT-1 et AT-2. Elle peut aussi augmenter l'expression de l'ARN messager de l'angiotensinogène et de la rénine (*Reudelhuber et al. 2007 ; Crowley et al. 2006*). Les ERO peuvent stimuler l'hypertrophie induite par les protéines G via les récepteurs adrénergiques. β_1 AR et β_2 AR, deux récepteurs qui sont couplés à la protéine Gs, stimulent la production d'AMPc et ainsi active la PKA. La PKA phosphoryle de nombreuses protéines telles que la troponine I, la phospholamban et les canaux calciques de type L (*Muthumala et al. 2008*). L'AMPc se lie Epac (protéine échangeuse qui se lie directement à l'AMPc) qui stimule l'hypertrophie via une voie indépendante de la PKA (*Metrich et al. 2008*). La stimulation du récepteur β_1 AR peut promouvoir l'apoptose, la croissance de myocytes et l'hyperplasie de fibroblastes (*Mann et al. 1999 ; Communal et al. 1999*). Les ERO peuvent aussi avoir des effets sur la matrice extracellulaire en activant les métalloprotéinases de la matrice et en stimulant la prolifération des fibroblastes cardiaques (*Cheng et al. 2003 ; Spinale et al. 2002*).

L'apoptose est aussi un mécanisme important qui contribue au développement de l'hypertrophie cardiaque (*Cesselli et al. 2001 ; Hang et al. 2007*). Des souris atteintes d'une déficience de la kinase-1 (ASK-1, protéine signalant l'apoptose), ont montré une baisse du remodelage cardiaque en réponse à une augmentation de la surcharge de pression (*Yamaguchi et al. 2003*). L'apoptose est inhibée quand les taux d'ERO sont faibles (*Kwon et al. 2003*).

Les ERO peuvent aussi directement influencer la fonction contractile des protéines cardiaques dans le couplage excitation-contraction. Elles modifient les groupements thiols des canaux à la ryanodine en modifiant leur probabilité d'ouverture (*Kawakami et al. 1998 ; Gonzalez et al. 2007*), oxydent les pompes Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique et inhibent ainsi la recapture du calcium (*Xu et al. 1998 ; Salido et al. 2009*).

Plusieurs études ont démontré récemment que l'eNOS pouvait participer aussi au remodelage cardiaque. Habituellement, l'eNOS produit du monoxyde d'azote pour stimuler la formation de GMPc qui permet d'inhiber la formation de fibrose et d'hypertrophie cardiaque par l'intermédiaire d'une régulation transcriptionnelle et d'une phosphorylation (*Xin et al. 2009*). L'inhibition chronique de l'hydrolyse du GMPc chez des souris soumises à une surcharge de pression peut atténuer le développement de l'hypertrophie des cardiomyocytes et la formation de fibrose (*Takimoto et al. 2005*). La présence accrue des ERO peut altérer cette régulation en transformant le NO en peroxynitrite, et ainsi diminuer la biodisponibilité du NO, l'activité et l'expression de la guanylate cyclase (*Munzel et al. 2005*). Dans ce cas, l'eNOS est alors génératrice d'anions superoxydes (*Xia et al. 1998 ; Takaya et al. 2007*).

L'activité et l'expression de la NADPH oxydase sont augmentées lors du développement d'une hypertrophie due à une surcharge de pression chez des cochons d'Inde (*Li et al. 2002*). Les ERO provenant de la NADPH oxydase peuvent découpler l'eNOS et activer la xanthine oxydase et ainsi amplifier la production d'ERO (*McNally et al. 2003 ; Murdoch et al. 2006*). Les ERO produites par la NADPH oxydase semblent

jouer un rôle important dans le remodelage cardiaque induit par l'angiotensine II (*Bendall et al. 2002 ; Johar et al. 2006*).

La xanthine oxydase joue un rôle dans le remodelage cardiaque. Un haut taux d'activité et d'expression de la xanthine oxydase a été observé chez des humains atteints d'insuffisance cardiaque (*Cappola et al. 2001*). Un traitement avec l'allopurinol a permis de réduire de façon significative le remodelage du ventricule et a amélioré la survie chez des souris atteintes d'une cardiomyopathie dilatée (*Engberding et al. 2004; Stull et al. 2004 ; George et al. 2009*). Les ERO provenant des mitochondries peuvent aussi contribuer au remodelage cardiaque mais leur rôle exact dans les premiers stades de développement de l'hypertrophie induite par une surcharge de pression reste à être déterminé (*Tsutsui et al. 2001 ; Meng et al. 2009*).

Les résultats obtenus lors des études précliniques pourraient nous laisser croire qu'il est possible de traiter les pathologies cardiovasculaires en traitant le stress oxydant. Cependant, les avancées dans ce domaine de recherche n'ont pu démontrer des résultats concluants entre le traitement thérapeutique du stress oxydant et la prévention ou le traitement de pathologies cardiovasculaires. Récemment, plusieurs études cliniques à grande échelle ont voulu étudier l'effet d'une administration d'antioxydants à des patients qui étaient à risque de développer une maladie cardiovasculaire. Par exemple, les études évaluant le rôle de la vitamine E (HOPE et GISSI) furent des échecs car elles ne purent montrer aucun impact significatif pour diminuer le taux de mortalité et/ou les issues cardiovasculaires (*GISSI-Prevenzione group's 1999 ; Yusuf et al. 2000*).

1.7 N-acétylcystéine (NAC)

La NAC est un composé thiol (contenant un groupement sulfhydrile) qui a pour formule chimique $C_5H_9NO_3S$ et un poids moléculaire 163.2 (voir figure 4). C'est un précurseur du glutathion (GSH). La NAC est rapidement absorbée suite à une dose orale mais seulement une très faible fraction de la dose atteint les tissus (cela est dû à un très puissant premier passage du métabolisme). La demi-vie de la NAC libre est de 2h15 environ et sa concentration maximale sanguine est atteinte une heure après son ingestion, et sa concentration sanguine n'est plus détectable 10 à 12 heures après son absorption au niveau sanguin. Le groupement SH de la molécule est responsable de son activité métabolique alors que le groupement acétyl amino substitué participerait à la stabilisation de la molécule (*Kelly et al. 1998*). Sa faible biodisponibilité *per os* (2 à 4 heures) est due en partie à sa formation de ponts disulfides avec des protéines et à sa déacétylation dans la lumière intestinale.

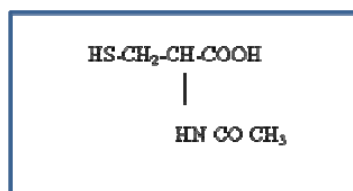


Figure 4. Formule chimique de la N-acétylcystéine.

La NAC est métabolisée en plusieurs composés puisque le taux de protéines SH, les groupements non protéiques SH ainsi que les groupements thiols augmenteraient suite à une dégradation intestinale de la NAC (*Sjodin et al. 1989*). Dans plusieurs modèles animal, le glutathion et la NAC sont présents sous forme réduite et oxydée dans le plasma de la veine porte hépatique suite à une ingestion de NAC (*Kelly et al. 1998*). Par contre, les sulfites inorganiques et la cystéine sont les principaux métabolites de la NAC

qui arrivent au foie. Cette transformation de la NAC est probablement ce qui confère à la molécule ses effets bénéfiques (*Cotgreave et al. 1987*).

Selon les chercheurs, les effets bénéfiques de la NAC seraient expliqués par sa capacité à réduire la cystine extracellulaire en cystéine et par sa transformation en métabolites SH. Cette augmentation des métabolites SH stimulerait la glutathione-S-transférase, une enzyme responsable de détoxifier l'organisme en luttant contre les ERO (*de Vries et al. 1993*). La NAC peut stimuler la biosynthèse du GSH et stimuler l'augmentation de l'incorporation de cystine par les cellules et peut ainsi augmenter la biosynthèse cellulaire de GSH (*Issels et al. 1988*). Elle peut augmenter les réserves de GSH dans les globules rouges, dans les hépatocytes et le poumon selon certaines études. Elle peut aussi régénérer ses réserves (*De Flora et al. 1985; Nakata et al. 1996; Atkuri et al. 2007*).

La NAC a des effets thérapeutiques pour lutter contre plusieurs maladies cardiovasculaires. Elle a des effets positifs sur les taux d'homocystéines et de lipoprotéines (qui sont responsables de maladies cardiaques). Elle améliore l'efficacité de la nitroglycérine et protège contre les effets délétères de l'ischémie/reperfusion. Des études ont montré qu'une dose de 2 à 4 g de NAC pouvait diminuer le taux de lipoprotéines de 70% chez des patients (*Gavish et al. 1991*). Des chercheurs ont montré qu'une dose de NAC pouvait réduire les taux d'homocystéines de 45% chez des patients (*Wiklund et al. 1996*). L'ischémie/reperfusion est caractérisée par une baisse des groupements SH et une augmentation du stress oxydant. Une étude a démontré que la NAC limite la baisse de GSH et de protéines SH (*Ceconi et al. 1988*).

La combinaison de la NAC avec la nitroglycérine (NTG) et la streptokinase a permis de diminuer la formation de stress oxydant et d'améliorer la préservation de la fonction ventriculaire gauche chez les patients à risque d'infarctus du myocarde aigu. Les patients prétraités à la NAC ont eu une préservation de la performance myocardique et une atténuation des dommages aux tissus sous-oxygénés chez des patients soumis à une ventilation hyperoxique (*Arstall et al. 1995*).

La NAC peut potentialiser les effets anti-plaquettaires et dilatateurs des coronaires de la NTG et prévenir la tolérance à la NTG. La combinaison de NAC et de NTG semble être efficace contre l'angine instable mais son utilité thérapeutique serait limitée à cause du haut taux d'effets secondaires (environ 35%, principalement des maux de tête) (*Sochman et al. 1996*).

Peu d'études ont été faites pour évaluer les effets secondaires de la NAC. La plupart d'entre elles ont montré que la NAC pouvait induire des effets secondaires bénins comme des nausées ou des céphalées (*Millea 2009*). Par contre, l'étude de Palmer et al. (2007) a observé qu'une administration chronique de NAC chez des souris pouvait favoriser le développement d'une hypertension pulmonaire artérielle. La présence accrue de NAC et de S-nitrosothiols serait interprétée par les cellules pulmonaires comme étant un signal d'hypoxie. Un remodelage du poumon se ferait alors observé. Il est possible que cet effet ne soit spécifique qu'à cette espèce. D'autres études seront nécessaires pour le déterminer. Il serait donc possible que la NAC ne puisse empêcher une baisse de la mortalité dans les études cliniques malgré ses effets anti-inflammatoires et antioxydants. Cet effet secondaire reste à être surveillé lors d'études à plus grande échelle et à plus long terme. Il devra être pris en considération si l'on décide de choisir la NAC comme une

approche thérapeutique potentielle pour prévenir la dysfonction endothéliale coronarienne.

2. Hypothèses et buts

Dans notre laboratoire, il a été démontré que l'HVG, induite par surcharge de pression, est associée à une dysfonction endothéliale des artères coronaires épocardiques. Cette dernière se manifeste par une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium induites par les protéines Gq et Gi. Cette diminution de la relaxation maximale suggère une diminution de la biodisponibilité du NO pour les cellules musculaires lisses sous-jacentes, un fait également appuyé par la baisse de la production basale de la guanosine-3'5' monophosphate (GMPc) et de la concentration de produits stables de dégradation du NO c'est-à-dire les nitrites et les nitrates. (*Malo et al. 2003*). Dans notre modèle, il a été démontré que les concentrations plasmatiques d'hydroperoxydes lipidiques et d'angiotensine-II étaient significativement supérieures comparativement au groupe témoin. De plus, puisque le traitement antioxydant prévient le développement de l'HVG et l'augmentation des marqueurs du stress oxydant, ceci suggère que les espèces réactives oxygénées jouent un rôle dans le développement de l'HVG (*Aubin et al. 2006*).

Cette prémisse a donc justifié l'utilisation de l'antioxydant N-acétylcystéine, afin de déterminer si ce dernier pouvait inhiber ou freiner le développement de l'HVG ainsi que la dysfonction endothéliale des artères coronaires épocardiques qui lui est associée.

3. Matériel et méthode

3.1 Groupes expérimentaux

Vingt-et-un porcelets Landrace âgés de 8 semaines (Primiporc Inc, Saint-Gabriel de Brandon, Qc, Canada) ont été aléatoirement divisés en quatre groupes expérimentaux. Le groupe témoin (groupe 1) a été soumis à une thoracotomie antérolatérale gauche sans cerclage aortique (n=3) (chirurgie SHAM). Le groupe 2 a été soumis à un cerclage aortique pour une période de 60 jours (n=6). Le groupe 3 a subi un cerclage aortique et a reçu un traitement oral de N-acétylcystéine de 1000 mg/jour *per os* pendant 60 jours commençant le jour de la chirurgie) (n=6). Le groupe 4 a été soumis à un cerclage aortique et a reçu un traitement oral de N-acétylcystéine : 1000mg/par jour pendant 30 jours commençant le jour 30 (post-chirurgie) (n=6). Des gélules de 1000mg de NAC ont été administrées chez les groupes 3 et 4 chaque matin dans la nourriture. Les animaux ont été gardés et testés en accord avec les recommandations et directives sur les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire issues par le « Conseil canadien sur les animaux de recherche », et le « Comité interne pour les soins des animaux », suite à leur approbation du protocole.

	Procédure	Début du traitement	Durée du traitement
Groupe 1 (n=3)	Pas de cerclage aortique Chirurgie « SHAM »	Aucun	Aucune
Groupe 2 (n=6)	Cerclage aortique	Aucun	Aucune
Groupe 3 (n=6)	Cerclage aortique	Jour de la chirurgie (NAC 1000mg/jour)	60 jours
Groupe 4 (n=6)	Cerclage aortique	30 jours post-chirurgie (NAC 1000mg /jour)	30 jours

Tableau 1. Groupes expérimentaux

3.2 Procédure chirurgicale

Les porcelets furent anesthésiés par une injection intramusculaire d'un mélange de kétamine (20 mg/kg; Rogarsetic, Toronto, ON, Canada) et de xylazine (2mg/kg; Rompun, Cambridge, ON, Canada). La ventilation a été assurée au cours de la chirurgie par un mélange d'air et d'oxygène maintenant un taux de saturation artérielle minimal de 95%. L'anesthésie a été assurée par l'isoflurane 1% v/v (Abbott Laboratories, Montréal, Canada). La saturation artérielle et les niveaux d'acidose du sang ont été contrôlés; en cas de besoin, ils ont été rééquilibrés avec du bicarbonate de sodium (Abbott Laboratories, St-Laurent, QC, Canada). Un cathéter a ensuite été inséré dans une veine auriculaire pour

permettre l'administration d'antibiotiques au début de la chirurgie (Borgal 16 mg/kg; Intervet Canada Limited, QC, Canada). Une canulation veineuse a été réalisée au niveau de la veine fémorale droite afin d'assurer un suivi continu de la pression sanguine. Une sonde rectale a été utilisée pour mesurer la température corporelle.

La thoracotomie antérolatérale gauche a été effectuée au niveau du troisième espace intercostal, soit un emplacement offrant une vue optimale sur l'aorte ascendante pour la réalisation du cerclage aortique. À l'aide d'un cordon ombilical placé 3cm au-dessus des ostia coronariens, une diminution du gradient systolique maximal de 15 mmHg doit être atteinte afin de rencontrer les conditions permettant le développement de l'HVG. Le péricarde et le thorax furent ensuite refermés en plusieurs couches. Une injection intramusculaire d'un analgésique (Buprénorphine, 0,6mg/ml; Reckitt Benckiser Healthcare Limited, Dansom Lane, UK) fut administrée à la fin de la chirurgie ainsi qu'au cours des 3 jours suivant la procédure (en cas de besoin, le traitement pouvait s'étendre au-delà de cette période). Les animaux se sont réveillés dans une pièce isolée à température contrôlée.

3.3 Évaluation échocardiographique

3.3.1 Paramètres hémodynamiques du cerclage aortique

Les études échocardiographiques ont été réalisées avant la chirurgie, pour l'obtention de paramètres de base, et deux mois après le cerclage aortique, soit la veille du sacrifice, à l'aide d'une sonde M3S (2.0~4.3 Megahertz) et du système Vivid 7 Dimension (GE, Healthcare Ultrasound, Horten, Norway).

L'aorte ascendante a été observée par une vue longue parasternale afin de visualiser la région du cerclage aortique. Un Doppler a été utilisé pour évaluer la vitesse maximale et les gradients moyen et maximal observés au niveau du cerclage aortique.

3.3.2 Hypertrophie ventriculaire gauche

Le mode M échocardiogramme ventriculaire gauche longue vue parasternale fut utilisé afin de mesurer l'épaisseur du septum interventriculaire (IVS) et la paroi postérieure du ventricule gauche (LVPW). Pour chaque paramètre, la moyenne fut calculée à partir de trois mesures prises lors de trois cycles cardiaques consécutifs. La masse du ventricule gauche fut calculée en utilisant la formule suggérée par l'*American Society of Echocardiography*. Les données du ventricule gauche furent mesurées à la fin de la diastole et de la systole. La masse du ventricule gauche fut calculée en utilisant la formule : $\text{masse ventriculaire gauche} = 1,05 [(D + \text{LVPW} + \text{IVS})^3 - D^3] - 14\text{g}$, où D représente le diamètre de la cavité ventriculaire à la fin de la diastole.

3.4 Sacrifice et prélèvement des artères coronaires épigastriques

Après la durée respective de leur traitement, les porcelets des quatre différents groupes furent anesthésiés comme durant la procédure chirurgicale (voir ci-haut). Le sacrifice fut réalisé par exsanguination via une sternotomie médiane. Le cœur fut rapidement enlevé et placé dans une solution de Krebs-bicarbonate modifiée (composition en mmol/l : NaCl 118.3, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, EDTA 0.026, Dextrose 11.1; solution contrôle). Les artères coronaires

antérieure descendante gauche, circonflexe et droite ont été nettoyées de toute graisse et tissu conjonctif. Elles furent découpées en anneaux ayant une longueur de 4mm.

3.5 Étude de la réactivité vasculaire

Les anneaux furent placés dans des chambres d'organe remplies d'une solution de Krebs-bicarbonate (20 ml), maintenue à une température de 37°C et oxygénée avec un mélange de 95% O₂ / 5% CO₂. Les anneaux, suspendus entre 2 étriers en métal, ont été déposés dans les bains où une des extrémités était connectée à un transducteur de force isométrique. Les données furent enregistrées sur un logiciel d'acquisition de données (IOS3, Emka Inc., Paris, France). Après 30 minutes de stabilisation, la tension imposée aux anneaux fut progressivement augmentée jusqu'à la tension optimale de la courbe active de longueur-tension (approximativement 4,0 g). Cette dernière a préalablement été déterminée en la contraction obtenue en présence du chlorure de potassium (KCl; 30 mmol/L) à différents degrés d'étirement. Une contraction maximale fut déterminée avec le chlorure de potassium (KCl; 60 mmol/L). Les bains furent ensuite lavés et les anneaux qui n'avaient pas contracté avec le KCl furent exclus (taux d'exclusion de moins de 5%). Ensuite, toutes les études furent effectuées en présence d'indométhacine (10⁻⁵ mol/L; antagoniste de la production endogène de prostanoïdes), de propranolol (10⁻⁷ mol/L; antagoniste des récepteurs β-adrénergiques) et de la kétansérine (10⁻⁶ mol/L; incubé 45 minutes avant l'ajout de la sérotonine pour antagoniser les récepteurs 5-HT₂ des cellules musculaires lisses). Après 45 minutes de stabilisation, des concentrations croissantes de prostaglandine F_{2α} (de 2 X 10⁻⁶ à 10⁻⁵ mol/L) furent ajoutées afin d'atteindre une contraction de l'ordre de 50 % de la contraction maximale au KCl (60 mmol/L).

3.5.1 Relaxations dépendantes de l'endothélium

Les voies de signalisation de la relaxation dépendante de l'endothélium induite par le NO ont été étudiées par la construction de courbes concentration-réponse à la sérotonine (5-HT; 10^{-10} à 10^{-5} mol/L, un agoniste qui se lie aux récepteurs 5-HT_{1D} couplés aux protéines Gi) et à la bradykinine (BK; 10^{-12} à 10^{-6} mol/L, un agoniste qui se lie aux récepteurs B₂ couplés aux protéines Gq résultant ainsi en une libération de NO et d'EDHF).

3.5.2 Relaxations indépendantes de l'endothélium

Des courbes concentration-réponse au sodium nitroprussiate (SNP, donneur exogène de NO) furent construites (SNP 10^{-10} à 10^{-5}). Le SNP est utilisé comme un contrôle endothélium indépendant.

3.6 Évaluation de la fonction endothéliale

3.6.1 Quantification plasmatique des nitrites et de nitrates (NOx)

La production de NO synthétisée par l'eNOS fut évaluée par la mesure des taux de nitrites/nitrates, qui sont des produits stables de dégradation du facteur relaxant détectés. Les échantillons sanguins furent prélevés au niveau du sinus coronarien et mis dans des tubes EDTA afin de prévenir la coagulation. Les échantillons furent ensuite centrifugés à 4000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C. Le plasma fut préservé à -70°C jusqu'à l'analyse. Le rapport nitrite/nitrate fut évalué par un kit commercial (Nitrite/Nitrate Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

3.6.2 Quantification de la production basale vasculaire du GMPc

Les taux basaux de GMPc des artères coronaires épocardiques des différents groupes expérimentaux furent mesurés afin d'évaluer la biodisponibilité du NO. Suite au prélèvement des artères coronaires, quelques anneaux furent congelés dans de l'azote liquide et gardés à -70°C jusqu'au moment de l'analyse. Les échantillons furent ensuite pulvérisés, resuspendus dans une solution d'acide trichloroacétique (TCA; 6.25% w/vol). Ils furent ensuite centrifugés à 3000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant fut nettoyé avec une solution de diéthyle afin d'éliminer le TCA tout en préservant le GMPc. Finalement, le surnageant lavé a été séché à l'aide d'un jet d'azote gazeux pour obtenir le GMPc purifié sous forme de culot. Les taux de GMPc furent mesurés avec un immunodosage enzymatique non acétylé (HitHunter™ cGMP assay kit, Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada). Les concentrations obtenues furent ajustées aux taux de protéines mesurées dans les tissus en utilisant la technique de microdosage Bradford (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

3.7 Évaluation du stress oxydant

3.7.1 Taux plasmatiques d'hydroperoxydes lipidiques

Les échantillons de sang prélevés à partir du sinus coronarien avant et après le sacrifice furent mélangés dans un rapport 1 : 1 avec l'agent R extractant saturé de méthanol. Ce mélange fut vortexé avant d'ajouter le chloroforme froid (1mL). La solution fut ensuite centrifugée 1,500 x g pendant 5 minutes à 0°C. La couche la plus profonde de chloroforme a été prélevée et utilisée pour évaluer le taux de peroxydation

des lipides à l'aide d'un kit commercial (Lipid Hydroperoxide Assay, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

3.7.2 Dismutase vasculaire du superoxyde (SOD)

Les artères coronariennes épocardiques furent homogénéisées dans une solution tampon HEPES (20mM, pH 7,4 contenant 1 mM acide éthylèneglycol tétracétique (EGTA), 210 mM mannitol and 70mM sucrose) et ensuite centrifugées à 1,500 x g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant, contenant les SOD Cu/Zn cytosolique et mitochondriale, et extracellulaire et la SOD-Mn, fut enlevé et conservé à -70°C jusqu'à analyse. L'activité de l'enzyme fut évaluée avec un kit commercial (Superoxide Dismutase Assay, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

3.7.3 Peroxydase du glutathion

Les artères coronaires épocardiques furent lavées avec une solution tampon saline phosphate (pH 7.4). Le tissu fut ensuite homogénéisé dans une solution tampon froide (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA et 1mM DTT) et centrifugé à 10,000 x g pendant 15 minutes à 4°C. L'activité de l'enzyme fut évaluée par un kit commercial (Glutathione Peroxidase Assay Kit, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

3.7.4 Glutathion réduit (GSH)

Les échantillons sanguins furent prélevés dans un tube contenant l'anti-coagulant héparine. Ces échantillons furent ensuite centrifugés à 1,000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant fut ensuite enlevé. Les érythrocytes sont pris dans un tampon de lyse d'eau froide HPLC de volume équivalant à quatre fois leur volume. Ils furent ensuite

centrifugés à 10,000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le taux de glutathion fut quantifié par un kit commercial (Glutathione Assay Kit, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

3.8 Solutions et produits

Toutes les solutions furent préparées quotidiennement. La 5-hydroxytryptamine (sérotonine, 5-HT), la bradykinine, l'EDTA (acide éthylène diamine tetra acétique), l'indométhacine, la kétansérine, le propranolol, la prostaglandine F_{2α}, le mannitol, le méthanol et la N-acétylcystéine ont été achetés chez Sigma (Oakville, ON, Canada). L'EGTA fut acheté chez MP Biochemicals (Aurora, OH, USA) et le sucrose chez EMD Chemicals (Gibbstown, NJ, USA).

3.9 Analyse statistique et interprétation des données

Les relaxations sont exprimées en pourcentage de contraction à la prostaglandine F_{2α} pour la sérotonine et de contraction à la sérotonine pour la bradykinine pour chaque groupe et sont présentées en moyenne \pm la déviation standard (SEM). Des études ANOVA à mesures répétées ont été faites pour comparer les courbes concentrations-réponses. Les analyses de variance suivies du test post-hoc de Dunnett, en se basant sur le groupe non traité ayant un cerclage aortique comme groupe de référence, ont été utilisées afin de comparer les niveaux de nitrites/nitrates, la production basale de GMPc, les quantités plasmatiques de glutathion réduit et d'hydroperoxydes lipidiques ainsi que l'activité de la peroxydase de glutathion et de la dismutase de superoxyde. EC₅₀ et E_{max} furent mesurés pour chaque courbe concentration-réponse en utilisant une fonction

logistique à 5 paramètres avec le logiciel « Sigma-Plot curve fitting ». La valeur rapportée de pD2 représente le Log négatif de EC50. Pour ces paramètres, les différences entre les groupes furent évaluées avec un test t de Student non apparié. Une valeur de p inférieure à 0,05 fut considérée comme statistiquement significative.

4. Résultats

4.1 Résultats échocardiographiques

On observe une différence significative pour la vitesse maximale, le gradient moyen et le gradient maximal du flot sanguin de l'aorte ascendante entre les groupes 1 (chirurgie « SHAM ») ($111,9 \pm 21,4$; $4,4 \pm 1,4$; $2,8 \pm 1,0$) et 2 ($405,3 \pm 148,2$; $73,4 \pm 49,9$; $44,6 \pm 32,7$) ($p < 0,05$). Ceci indique la présence d'une sténose aortique dans le groupe 2. La vitesse maximale, le gradient moyen et le gradient maximal du flot sanguin de l'aorte ascendante des groupes 3 ($350,0 \pm 121,7$; $53,9 \pm 31,5$; $30,1 \pm 18,6$) et 4 ($315,7 \pm 96,1$; $42,9 \pm 22,1$; $23,7 \pm 13,3$) sont significativement diminués par rapport au groupe 2 ($p < 0,05$) (voir tableau 1).

Le rapport de la masse du ventricule gauche sur la masse corporelle et la masse cardiaque sur la masse corporelle sont de meilleures mesures de l'HVG. Les rapports masse du ventricule gauche/masse corporelle ($3,91 \pm 0,02$) et masse du cœur/masse corporelle ($6,3 \pm 0,02$) du groupe 2 étaient significativement supérieurs par rapport au groupe 1 (chirurgie « SHAM ») ($1,74 \pm 2,1$ et $5,38 \pm 3,1$ respectivement ; $p < 0,05$) ce qui confirme la présence d'une HVG. Les rapports masse du ventricule gauche/masse corporelle et masse du cœur/masse corporelle des groupes 3 ($2,81 \pm 1,2$; $5,44 \pm 2,7$) et 4 ($2,63 \pm 1,1$; $5,77 \pm 1,2$) étaient significativement diminués par rapport au groupe 2 ($p < 0,05$). Ceci indique que le traitement de NAC a permis d'atténuer le développement de l'HVG (voir tableau 2).

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Vélocité maximale (cm/s)	111,9±21,4*	405,3±148,2	350,0±121,7*	315,7±96,1*
Gradient maximal (mmHg)	4,4±1,4*	73,4±49,9	53,9±31,5*	42,9±22,1*
Gradient moyen (mmHg)	2,8±1,0*	44,6±32,7	30,1±18,6*	23,7±13,3*

Tableau 2. Données échocardiographiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM.

* p<0,05 versus groupe 2 (HVG).

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Masse VG (g)	71,9±4,28*	169,1±49,7	137,5±17,8*	113,2±20,8*
Masse cœur (g)	220	268	255	260
Masse corporelle (kg)	41,0±3,1	43, 2±2,3	46,8±1,2	45,0±2,0
Masse VG/ Masse corporelle (g/kg)	1,74 ±2,1*	3,91± 0,02	2,81± 1,2*	2,63 ±1,1*
Masse cœur/ masse corporelle (g/kg)	5,38 ±3,1*	6,3± 0,02	5,44± 2,7*	5,77 ±1,2*

Tableau 3. Données morphologiques (VG ventricule gauche)

* p<0,05 versus groupe 2 (HVG).

4.2 Étude de la réactivité vasculaire

4.2.1 Relaxations dépendantes de l'endothélium

Les courbes concentration-réponse à la sérotonine et à la bradykinine des anneaux des artères coronaires épicaudiques provenant du groupe 2(HVG) (E_{max} : $18,5 \pm 0,01$ pour 5-HT ; $7,0 \pm 0,01$ pour BK) ont démontré une réduction significative des relaxations par rapport au groupe 1 (chirurgie « SHAM ») (E_{max} : $38,0 \pm 0,02$ pour 5-HT ; $1,0 \pm 0,01$ pour BK), ce qui confirme la présence d'une dysfonction endothéliale (voir figures 1, 2 et tableau 3) ($p < 0,05$). Les courbes concentration-réponse des groupes 3 et 4 traités à la NAC ont montré une amélioration significative des relaxations dépendantes de l'endothélium induite par la sérotonine et la bradykinine par rapport au groupe 2 (E_{max} : $43,4 \pm 0,02$ pour 5-HT ; $1,0 \pm 1$ pour BK pour groupe 3) (E_{max} $35,7 \pm 0,01$ pour 5-HT ; $1,0 \pm 1$ pour BK pour groupe 4) ($p < 0,05$) (voir figures 1, 2 et tableau 3).

Relaxations dépendantes de l'endothélium des artères coronaires porcines induites par la sérotonine chez le groupe 1 (chirurgie « SHAM »), le groupe 2 (HVG), le groupe 3 (NAC 60 jours) et le groupe 4 (NAC 30 jours)

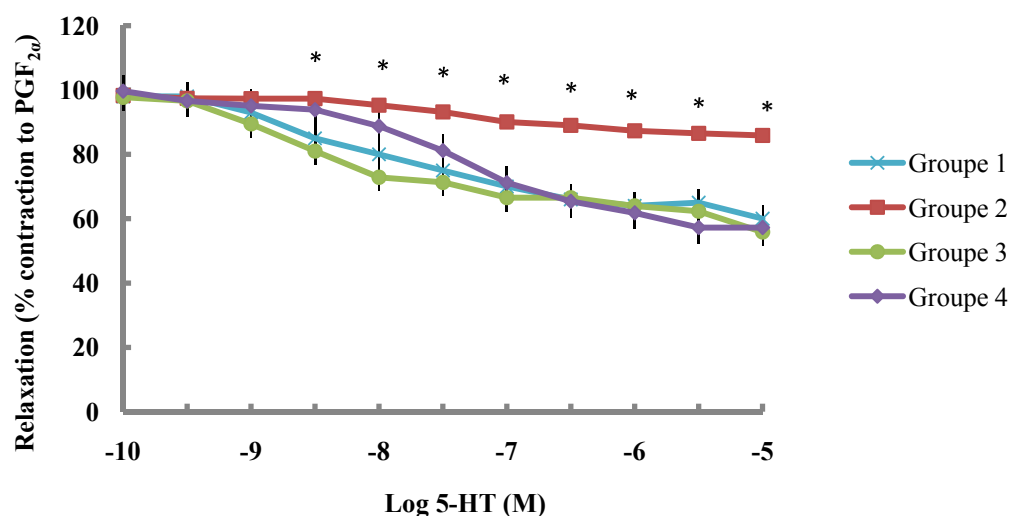


Figure 5. Courbes cumulatives concentration-réponse à la sérotonine (5-HT) des anneaux des artères coronaires épicaudiques.

Les réponses sont données en pourcentage de relaxation de la contraction induite par la prostaglandine $F_{2\alpha}$. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ versus groupe 2 (HVG).

Relaxations dépendantes de l'endothélium des artères coronaires porcines induites par la bradykinine chez le groupe 1 (chirurgie « SHAM »), le groupe 2 (HVG), le groupe 3 (NAC 60 jours) et le groupe 4 (NAC 30 jours)

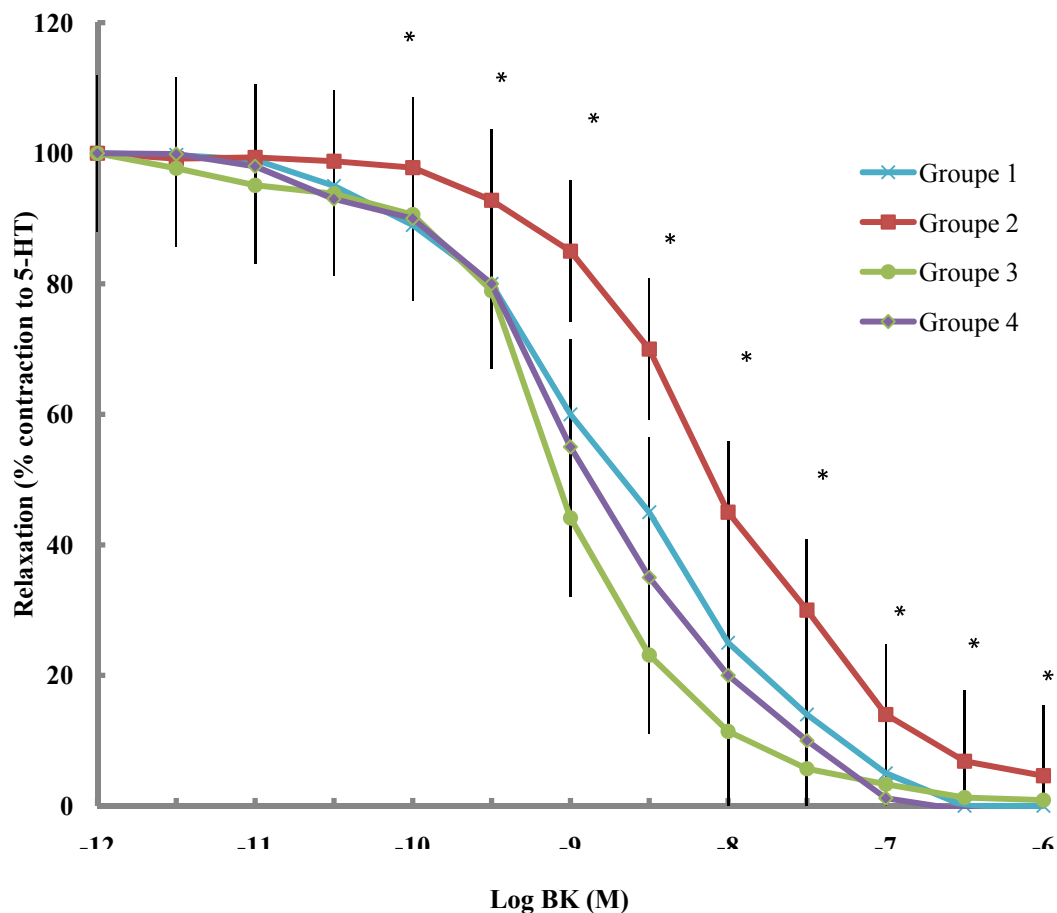


Figure 6. Courbes cumulatives concentration-réponse à la bradykinine (BK) des anneaux des artères coronaires épicaudiques.

Les réponses sont données en pourcentage de relaxation de la contraction induite par la sérotonine. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ versus groupe 2 (HVG).

	Emax	
	Sérotonine	Bradykinine
Groupe 1	38,0±0,01*	1,0±0**
Groupe 2	18,5±0,01	7,0±0,01
Groupe 3	43,4±0,02+	1,0±1
Groupe 4	35,7±0,01/	1,0±1

Tableau 4. Emax des courbes concentration-réponse induites par la sérotonine et la bradykinine.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. Emax représente le pourcentage maximal de relaxation. *p<0,001 versus groupe témoin; **p<0,05, versus groupe témoin; +/ p<0.001 versus le groupe 2.

4.2.2 Relaxations indépendantes de l'endothélium

Aucune différence significative n'a été observée entre les relaxations maximales (E_{max}) au sodium nitroprussiate des différents groupes ($99,1 \pm 0,01$ pour groupe 1, $99,0 \pm 0,02$ pour groupe 2, $99,1 \pm 0,02$ pour groupe 3 et $99,3 \pm 0,02$ pour groupe 4 respectivement ; $p > 0,05$). Aucune différence n'a été observée entre les pD_2 des différents groupes ($8,63 \pm 0,02$ pour le groupe 1, $8,68 \pm 0,04$ pour le groupe 2, $8,71 \pm 0,02$ pour le groupe 3 et $8,69 \pm 0,01$ pour le groupe 4 respectivement ; $p > 0,05$) (voir figure 3).

Relaxations indépendantes de l'endothélium des artères coronaires porcines induites par le sodium nitroprussiate chez le groupe 1 (chirurgie « SHAM »), le groupe 2 (HVG), le groupe 3 (NAC 60 jours) et le groupe 4 (NAC 30 jours)

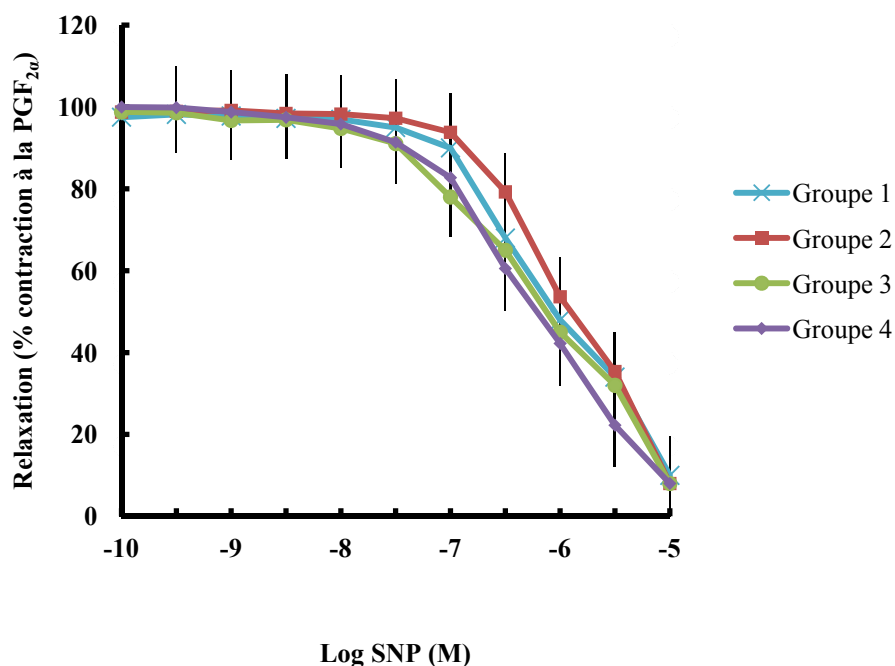


Figure 7. Courbes cumulatives concentration-réponse au sodium nitroprussiate (SNP) des artères coronaires épicaardiques.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM.

4.3 Fonction endothéliale

4.3.1 Concentrations plasmatiques de nitrites/nitrates

Les concentrations plasmatiques de nitrites/nitrates du groupe 2 ($18,2 \pm 0,01$) sont significativement inférieures par rapport au groupe 1 (chirurgie « SHAM ») ($94,8 \pm 0,01$; $p < 0,001$), attestant une diminution de la biodisponibilité du facteur relaxant NO. Les taux plasmatiques de nitrites/nitrates furent significativement plus élevés dans le groupe 3 ($48,5 \pm 0,01$; $p < 0,001$) et le groupe 4 par rapport au groupe 2 ($43,2 \pm 0,02$; $p < 0,001$) (voir figure 4).

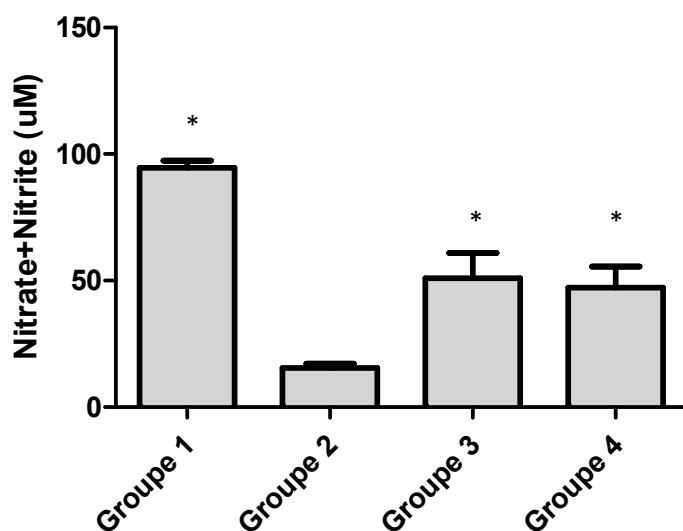


Figure 8. Concentrations plasmatiques de nitrites/nitrates.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0,001$ versus groupe 2.

4.3.2 Concentrations vasculaires de GMPc

Les concentrations vasculaires de GMPc sont significativement inférieures dans le groupe 2 (groupe HVG; $5,33 \pm 0,02$) comparativement au groupe 1 (chirurgie « SHAM) ($7,13 \pm 0,01$; $p < 0.05$) confirmant par une seconde technique la diminution de la biodisponibilité du NO. Les concentrations du second messager chez les deux groupes traités au NAC sont significativement plus élevés par rapport au groupe 2 ($7,66 \pm 0,01$ pour groupe 3 et $7,64 \pm 0,01$ pour groupe 4 respectivement ; $p < 0.05$) (voir figure 5).

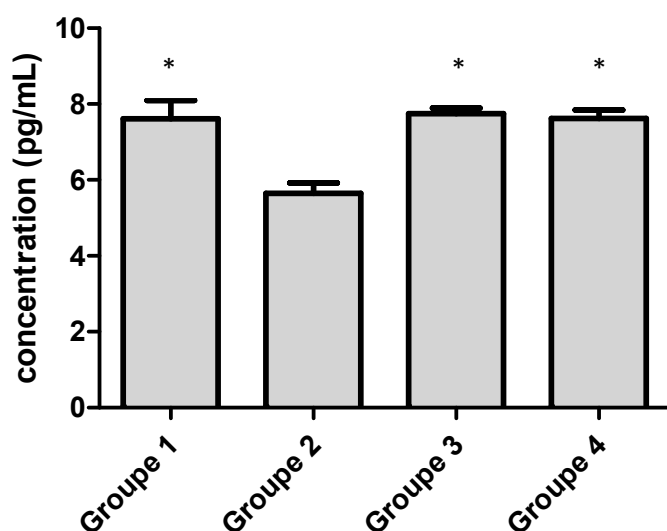


Figure 9. Concentrations vasculaires de GMPc.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ versus groupe 2.

4.4 Stress oxydant

4.4.1. Concentrations plasmatiques d'hydroperoxydes lipidiques

Les concentrations d'hydroperoxydes lipidiques sont significativement supérieures chez le groupe 2 ($6,2 \pm 0,01$) par rapport au groupe 1 ($3,42 \pm 0,01$; $p < 0,05$). Les taux des hydroperoxydes lipidiques des deux groupes traités 3 ($4,32 \pm 0,01$) et 4 ($3,85 \pm 0,01$) sont significativement inférieurs par rapport au groupe 2 ($p < 0,05$) suggérant que le traitement au NAC a prévenu l'augmentation de l'impact négatif des espèces réactives oxygénées (voir figure 6).

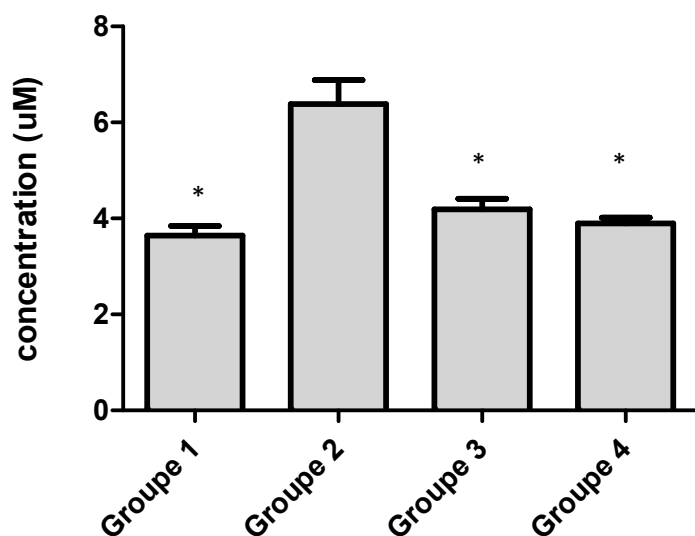


Figure 10. Concentrations plasmatiques des hydroperoxydes lipidiques.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ versus groupe 2.

4.4.2 Activité vasculaire de la dismutase du superoxyde

L'activité de la dismutase de superoxyde n'est pas altérée chez les animaux présentant une HVG ($1,46 \pm 0,01$; $p=0,9$). Ceci peut expliquer l'absence d'impact du traitement avec NAC au niveau de l'activité de cette enzyme antioxydante ($1,47 \pm 0,01$ pour le groupe 3 et $1,48 \pm 0,01$ pour le groupe 4 respectivement ; $p=0,9$) (voir figure 7).

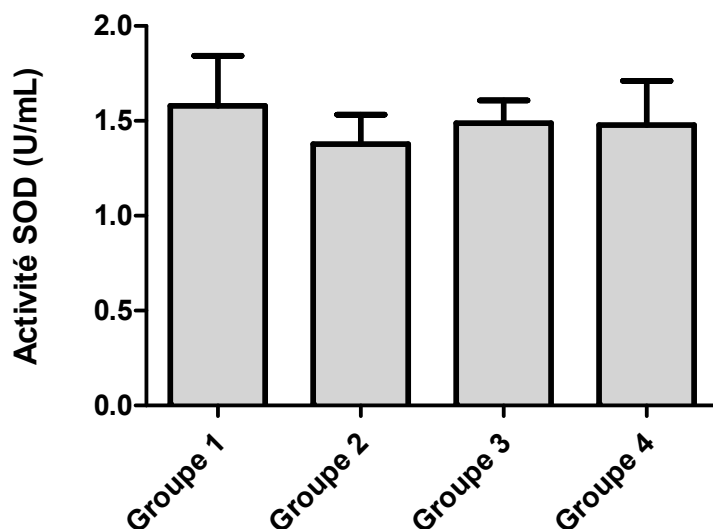


Figure 11. Activité vasculaire de la dismutase du superoxyde.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM.

4.4.3 Concentrations plasmatiques du glutathion réduit

Les concentrations de glutathion réduit étaient inférieures dans le groupe 2 ($8,2 \pm 0,01$) par rapport au groupe 1 ($16,8 \pm 0,01$; $p < 0,05$). Les taux de glutathion des groupes 3 ($34,2 \pm 0,01$) et 4 ($18,2 \pm 0,01$) sont significativement plus élevés par rapport au groupe 2 ($p < 0,03$) (voir figure 8).

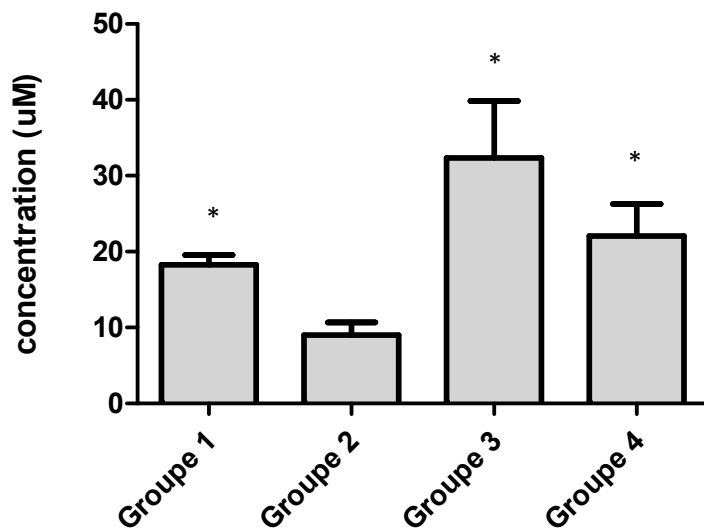


Figure 12. Concentrations plasmatiques de glutathion réduit.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ versus groupe 2.

4.4.4 Activité de la peroxydase de glutathion vasculaire

L'activité de peroxydase de glutathion vasculaire est significativement diminuée chez le groupe 2 ($62,7 \pm 0,01$) par rapport au groupe 1 ($108,5 \pm 0,01$; $p < 0,05$). L'activité de la peroxydase du glutathion vasculaire est significativement augmentée chez les deux groupes traités 3 ($125,7 \pm 0,01$) et 4 ($96,7 \pm 0,01$) par rapport au groupe 2 ($p < 0,002$) (voir figure 9).

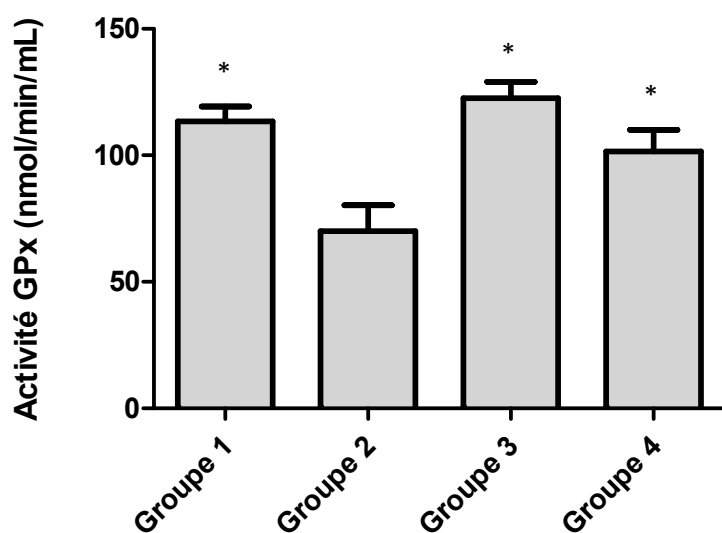


Figure 13. Activité de la peroxydase du glutathion vasculaire (GPx)

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ versus groupe 2.

5. Discussion

5.1 Introduction

Les principales découvertes de cette étude sont que, dans un modèle porcin d'HVG 1) la N-acétylcystéine a ralenti la progression de l'HVG, 2) a amélioré les relaxations dépendantes de l'endothélium des artères coronaires épicaudiques. Ceci semble être la conséquence de l'augmentation de la biodisponibilité du NO (GMPc et NO_x) et cette dernière semble être la conséquence d'une diminution du stress oxydant (tel que démontré par les marqueurs : concentrations plasmatiques des hydroperoxydes lipidiques, de glutathion réduit et l'activité de la peroxidase de glutathion).

L'HVG est un mécanisme adaptatif qui se développe en réponse à une augmentation de la surcharge cardiaque causée par de l'hypertension ou une sténose aortique. Alors que cette adaptation morphologique est initialement bénéfique pour contrer la surcharge, la persistance des mécanismes sous-jacents mène à la progression vers l'insuffisance cardiaque. Ainsi cette pathologie est maintenant considérée comme un puissant indicateur des maladies cardiovasculaires (*Choukroun et al. 2002*).

Les patients atteints d'une dysfonction endothéliale associée à une hypertrophie ventriculaire gauche ont de très hauts taux de morbidité. Même si les techniques chirurgicales pour remplacer ou réparer les valves aortiques se sont améliorées, ces nouvelles avancées technologiques pour traiter l'HVG sont toujours associées à un risque élevé de mortalité (*Rajappan et al. 2002*). Un traitement pharmacologique serait une alternative idéale.

5.2 Stress oxydant et hypertrophie cardiaque

Plusieurs études ont démontré que le stress oxydant a un rôle fondamental dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. Le peroxyde d'hydrogène, un médiateur du stress oxydant, peut activer des kinases (dont la tyrosine kinase Src ou la protéine kinase C) ou des facteurs de transcription (par exemple la protéine Ras) qui sont impliqués dans la formation d'hypertrophie de cardiomyocytes de rats néonataux (*Aikawa et al. 2001, Sabri et al. 1998, Wei et al. 2001*). De plus, les espèces réactives oxygénées sont aussi impliquées dans la stimulation hypertrophique via les protéines G induites par l'angiotensine II et une stimulation α -adrénergique (*Nakamura et al. 1998; Tanaka et al. 2001; Xiao et al. 2001*). L'anion superoxyde (un autre médiateur du stress oxydant) stimule la prolifération des fibroblastes cardiaques de rats et l'activation de métalloprotéinases matricielles (*Siwik et al. 2001; Spinale et al. 2002; Sorescu et al. 2002*). Le stress oxydant via le peroxyde d'hydrogène peut activer l'apoptose de cardiomyocytes de rats en induisant des dommages à l'ADN et aux mitochondries via l'augmentation de l'activité de ERK $\frac{1}{2}$ (*Takimoto et al. 2007*).

Dans le groupe 2 (HVG), on observe une augmentation du rapport la masse du ventricule gauche sur la masse corporelle par rapport au groupe 1 (chirurgie « SHAM ») confirmant la présence d'une HVG. La NAC a permis de freiner le développement de l'hypertrophie du ventricule gauche dans les groupes 3 et 4. Byrne et al. (2003) et Nakagami et al. (2003) ont observé que la NAC pouvait limiter la progression de l'HVG induite par une injection chronique d'angiotensine II chez des souris en neutralisant l'anion superoxyde. Chen et al. (2003) ont démontré que la NAC peut prévenir l'hypertrophie de cardiomyocytes de souris induite par le peroxyde d'hydrogène *in vitro*.

5.3 Glutathion

Plusieurs études cliniques ont démontré qu'une supplémentation riche en groupement thiols (carbone relié à un groupement SH) avait des effets bénéfiques en améliorant les vasodilatations dépendantes de l'endothélium périphériques et coronariennes chez des patients atteints d'athérosclérose (*Andrews et al. 2000*) (*Prasad et al. 1999*) (*Kugiyama et al. 1998*).

Le glutathion réduit est un puissant antioxydant endogène qui a été étudié depuis plusieurs années (*Groen et al. 1996*). Il fournit le groupement SH à la peroxidase du glutathion qui l'utilise comme substrat pour piéger les radicaux libres (*Ortolani et al. 2000*) et détoxifie le peroxy-nitrite dans les cellules endothéliales vasculaires bovines (*Ma et al. 1994* ; *Buckley et al. 2000*). De plus, Myers et al. (1990) ont démontré que dans des cellules endothéliales de l'aorte bovine, les S-nitrosothiols, qui ont une demi-vie plus longue que le NO, peuvent fortement stimuler la guanylate cyclase et potentialiser les effets du NO. Il est fortement probable que ces thiols améliorent le transport cytoplasmique et transmembranaire du NO des cellules endothéliales vers les cellules musculaires lisses mais le mécanisme précis reste à être élucidé (*Prasad et al. 1999*). Plusieurs études cliniques ont rapporté que des patients atteints de maladies cardiovasculaires ont des taux de glutathion plasmatique inférieur à des sujets contrôles suggérant que le glutathion pourrait avoir un rôle protecteur contre ces pathologies (*Julius et al. 1994*; *Nuttall et al. 1998*; *Morrison et al. 1999*).

5.3.1 Concentrations plasmatiques de glutathion

Le groupe 2 (HVG non traité) présente une concentration plasmatique de glutathion réduit significativement inférieure à celle du groupe 1 (chirurgie « SHAM »). Une augmentation du stress oxydant peut entraîner une baisse des réserves plasmatique et vasculaire de glutathion des cellules endothéliales vasculaires bovines suite à une ischémie/reperfusion du myocarde (*Aucoin et al. 1995*). De plus, chez des rats spontanément hypertendus, les concentrations plasmatiques de glutathion réduit étaient diminuées dans les cellules musculaires lisses aortiques (*Wu et al. 2001*). Les lapins hypercholestérolémiques qui ont des relaxations altérées induites par le NO, présentent des taux de glutathion significativement diminués (*Adachi et al. 2000*). Des adolescents ayant des antécédents familiaux de maladies coronariennes présentent des taux très faibles de glutathion (*Morrison et al. 1999*). Une diminution significative des taux plasmatiques et vasculaires de glutathion sont maintenant considérés comme un marqueur de stress oxydant (*Aucoin et al. 1995*).

On observe une augmentation des concentrations plasmatiques du glutathion réduit dans les groupes 3 et 4 (HVG traités) qui peut être expliquée par l'administration de NAC. La NAC serait considérée comme le précurseur primaire du glutathion. Bourraindeloup et al. (2004) ont montré qu'une administration chronique de NAC peut augmenter les concentrations plasmatiques de glutathion dans les cardiomyocytes de rats hypertendus. Le taux tissulaire de glutathion réduit pourrait être un indicateur de la sévérité de l'insuffisance cardiaque. Kugiyama et al. (1998) ont suggéré que les effets induits par le glutathion sont dus à une rapide auto-oxydation de la cystéine, une réduction des molécules dissulfides en composés sulfhydryls et une instabilité de la nitrocystéine dans un milieu aqueux.

5.4 Relaxations dépendantes de l'endothélium

Les relaxations dépendantes de l'endothélium induites par la sérotonine et la bradykinine du groupe 2 HVG (non traité) sont significativement diminuées par rapport au groupe 1. Les concentrations vasculaires de GMPc sont significativement inférieures à celles du groupe témoin. Ceci confirme la présence d'une dysfonction endothéliale.

Pour les groupes 3 et 4 (HVG traités), on a observé une amélioration des relaxations dépendantes de l'endothélium induites par la sérotonine et la bradykinine. De plus, les concentrations vasculaires de GMPc sont augmentées significativement par rapport au groupe 2. Une explication possible pour l'augmentation de la biodisponibilité du NO serait que le glutathion est un thiol endogène qui forme un composé actif et stable : le S-nitrosoglutathione (un EDHF potentiel) (*Stamler JS et al. 1996*). Ces thiols ont une demi-vie plus longue que le NO et amélioreraient le transport du NO de la cellule endothéliale vers les cellules musculaires lisses (*Prasad et al. 1999*). De plus, Cheung et al. (1997) ont démontré que le glutathion peut améliorer les vasodilatations coronariennes de rats via un mécanisme dépendant du NO et de la guanylate cyclase. De plus, les productions basales et celles induites par le calcium ionophore peuvent être augmentées dans les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines en présence de glutathion (*Ghigo et al. 1993*) suggérant que la synthèse de NO et non l'action du NO sur la guanylate cyclase qui requiert la présence de glutathion. Le glutathion peut aussi protéger l'eNOS contre l'inactivation induite par le NO (*Griscavage et al. 1995*) et la formation de NO peut être potentialisée par le glutathion via le S-nitrosoglutathione (*Mayer et al. 1995*).

5.5 Relaxations indépendantes de l'endothélium

Aucune différence statistique n'est observée pour les relaxations indépendantes de l'endothélium (pD_2 et E_{max}) entre les différents groupes expérimentaux. Ceci démontre que la dysfonction de la réactivité vasculaire est due à la dysfonction des cellules endothéliales puisque les cellules musculaires lisses sous-jacentes présentent encore leur pleine capacité de relaxation (propriétés vasorelaxantes des cellules musculaires lisses préservées).

5.6 Activité de la peroxydase de glutathion

La peroxydase de glutathion participe activement à la défense cellulaire contre le stress oxydant et est essentielle dans le maintien de la fonction endothéliale. Dans notre étude, nous avons observé une baisse de l'activité de la peroxydase de glutathion dans le groupe 2 HVG non traité par rapport au groupe 1 (chirurgie « SHAM »). Une déficience de l'activité de la peroxydase de glutathion est associée à une augmentation du stress oxydant et au développement de dysfonction endothéliale dans des cellules endothéliales vasculaires porcines (*Toborek et al. 1995*), murines (*Forgione et al. 2002*) et chez des souris hyperhomocystéinémiques (*Weiss et al. 2006*). Dayal et al. (2002), ont démontré que des souris hyperhomocystéinémiques, ayant le gène de la peroxydase invalidé, étaient plus propices à développer une dysfonction endothéliale vasculaire.

L'administration de NAC chez les groupes 3 et 4 HVG traités a restauré l'activité de la peroxydase de glutathion. Une déficience en peroxydase de glutathion avec une dysfonction endothéliale peuvent être corrigées par une supplémentation de glutathion ou de NAC dans des cellules endothéliales vasculaires murines (*Forgione et al. 2002*) ou en augmentant l'activité de la peroxydase de glutathion des cellules endothéliales vasculaires de souris hyperhomocystéinémiques (*Postea et al. 2006*). L'administration

per os de la NAC chez les humains atteints de néphropathie chronique peut stimuler une augmentation de l'activité de la peroxydase de glutathion GPx-1 des érythrocytes et une baisse des taux des hydroperoxydes plasmatiques (Zachara *et al.* 2006), également démontré chez des rats hyperglycémiques et dyslipidémiques (Diniz *et al.* 2006) et dans des cellules endothéliales d'artères pulmonaires porcines (Toborek *et al.* 1995).

5.7 Concentrations plasmatiques d'hydroperoxydes lipidiques

Dans le groupe 2 avec HVG non traité, on observe une augmentation des concentrations plasmatiques des hydroperoxydes lipidiques indique la présence accrue de stress oxydant. Dans les groupes 3 et 4 traités avec la NAC, on observe une diminution des concentrations plasmatiques des hydroperoxydes lipidiques attestant une baisse de la présence du stress oxydant. Toborek *et al.* (2002) ont remarqué que la NAC, une diminuait la peroxydation des lipides dans des cellules endothéliales vasculaires porcines et humaines exposées au TNF- α (Xia *et al.* 2006). Ceci suggère que la NAC diminue le stress oxydant en augmentant la concentration plasmatique de glutathion réduit et augmente ainsi l'activité de la peroxydase de glutathion. De plus, elle peut directement piéger les radicaux libres par l'intermédiaire de son groupement sulfhydryle (Cabassi *et al.* 2001).

5.8 Limites de l'étude

L'intervalle de temps de cette étude est idéal pour étudier les altérations de voies de signalisation de la transduction des cellules endothéliales dans un modèle d'HVG compensé. Pour des études à plus long terme (par exemple pour étudier un modèle d'insuffisance cardiaque), il serait préférable d'utiliser des porcs miniatures pour faciliter les manipulations. Même si dans ce modèle de cerclage aortique supra aortique, les

artères coronaires sont soumises à des forces de cisaillement différentes de celles observées dans des modèles d'hypertension systémique ou de sténose aortique valvulaire, aucune modification de perfusion des artères coronaires ne fut observée lors du développement de ce modèle.

Un groupe témoin avec placebo n'a pas été inclus dans cette étude car nos expériences précédentes n'ont démontré aucune différence significative au niveau des paramètres évalués entre des groupes témoins avec et sans placebo. Il aurait aussi été intéressant d'étudier les effets possibles de l'angiotensine II dans cette étude car ce peptide contribue de manière significative au développement de l'HVG et de la dysfonction endothéliale par une augmentation de la production d'espèces réactives oxygénées.

L'hypothèse que la synthèse de NO est augmentée est basée sur une augmentation des produits de dégradation du NO, attestant indirectement une augmentation de sa production. L'expression de la eNOS n'a pas été quantifiée par western blot ou ni son activité en mesurant la conversion de ^3H -Arg en ^3H -citrulline.

6. Conclusion

Les études précédentes dans notre laboratoire ont démontré qu'une période de 60 jours de cerclage aortique favorise le développement d'une hypertrophie ventriculaire gauche compensatoire et de la dysfonction endothéliale associée des artères coronaires épicaudiques. Dans la présente étude, un traitement chronique de la N-acétylcystéine a permis de ralentir la progression de l'HVG et de prévenir le développement de la dysfonction endothéliale vasculaire due aux propriétés antioxydantes du NAC puisque les marqueurs du stress oxydant étaient significativement inférieurs et les concentrations du facteur relaxant NO significativement supérieures comparativement au groupe HVG non traité. Des études cliniques seraient nécessaires pour évaluer les effets de la NAC chez des patients atteints d'une HVG ou prédisposés à la développer car l'HVG est considérée comme un facteur de risque indépendant de mortalité cardiovasculaire.

7. Bibliographie

1. **Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* (1999) **354**(9177):447-455.**
2. Adachi T, Cohen RA: **Decreased aortic glutathione levels may contribute to impaired nitric oxide-induced relaxation in hypercholesterolaemia.** *Br J Pharmacol* (2000) **129**(5):1014-1020.
3. Aikawa R, Nagai T, Tanaka M, Zou Y, Ishihara T, Takano H, Hasegawa H, Akazawa H, Mizukami M, Nagai R, Komuro I: **Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy.** *Biochem Biophys Res Commun* (2001) **289**(4):901-907.
4. Ait-Oufella H. ME, Guidet B., Offenstadt g.: **The endothelium : a new organ.** *Réanimation* (2007) **17**(2):126-136.
5. Akki A, Zhang M, Murdoch C, Brewer A, Shah AM: **NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function.** *J Mol Cell Cardiol* (2009) **47**(1):15-22.
6. Alfonso-Prieto M, Biarnes X, Vidossich P, Rovira C: **The molecular mechanism of the catalase reaction.** *J Am Chem Soc* (2009) **131**(33):11751-11761.
7. Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL: **Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction.** *Circulation* (2004) **110**(15):2233-2240.

8. Andrews NP, Prasad A, Quyyumi AA: **N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function.** *J Am Coll Cardiol* (2001) **37**(1):117-123.
9. Arehart E, Gleim S, Kasza Z, Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J: **Prostacyclin, atherothrombosis, and cardiovascular disease.** *Curr Med Chem* (2007) **14**(20):2161-2169.
10. Arstall MA, Yang J, Stafford I, Betts WH, Horowitz JD: **N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effects.** *Circulation* (1995) **92**(10):2855-2862.
11. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA: **N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency.** *Curr Opin Pharmacol* (2007) **7**(4):355-359.
12. Aubin MC, Carrier M, Shi YF, Tardif JC, Perrault LP: **Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy.** *J Cardiovasc Pharmacol* (2006) **47**(5):702-710.
13. Aubin MC, Gendron ME, Lebel V, Thorin E, Tardif JC, Carrier M, Perrault LP: **Alterations in the endothelial G-protein coupled receptor pathway in epicardial arteries and subendocardial arterioles in compensated left ventricular hypertrophy.** *Basic Res Cardiol* (2007) **102**(2):144-153.
14. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM: **Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions.** *Hypertension* (1990) **15**(6 Pt 2):699-703.

15. Aucoin MM, Barhoumi R, Kochevar DT, Granger HJ, Burghardt RC: **Oxidative injury of coronary venular endothelial cells depletes intracellular glutathione and induces HSP 70 mRNA.** *Am J Physiol* (1995) **268**(4 Pt 2):H1651-1658.

16. Babior BM: **NADPH oxidase: an update.** *Blood* (1999) **93**(5):1464-1476.

17. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T: **Mitochondria, oxidants, and aging.** *Cell* (2005) **120**(4):483-495.

18. Bauml MA, Underwood DA: **Left ventricular hypertrophy: an overlooked cardiovascular risk factor.** *Cleve Clin J Med* (2010) **77**(6):381-387.

19. Bayir H, Kagan VE: **Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory.** *Crit Care* (2008) **12**(1):206.

20. Behrendt D, Ganz P: **Endothelial function. From vascular biology to clinical applications.** *Am J Cardiol* (2002) **90**(10C):40L-48L.

21. Bendall JK, Heymes C, Ratajczak P, Samuel JL: **Extracellular matrix and cardiac remodelling.** *Arch Mal Coeur Vaiss* (2002) **95**(12):1226-1229.

22. Berry CE, Hare JM: **Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications.** *J Physiol* (2004) **555**(Pt 3):589-606.

23. Bevers LM, Braam B, Post JA, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, Koomans HA, Verhaar MC, Joles JA: **Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase.** *Hypertension* (2006) **47**(1):87-94.

24. Blank RS, Owens GK: **Platelet-derived growth factor regulates actin isoform expression and growth state in cultured rat aortic smooth muscle cells.** *J Cell Physiol* (1990) **142**(3):635-642.

25. Blumenfeld JD, Sealey JE, Mann SJ, Bragat A, Marion R, Pecker MS, Sotelo J, August P, Pickering TG, Laragh JH: **Beta-adrenergic receptor blockade as a therapeutic approach for suppressing the renin-angiotensin-aldosterone system in normotensive and hypertensive subjects.** *Am J Hypertens* (1999) **12**(5):451-459.

26. Bohm F, Pernow J: **The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease.** *Cardiovasc Res* (2007) **76**(1):8-18.

27. Bolton TB, Gordienko DV, Pucovsky V, Parsons S, Povstyan O: **Calcium release events in excitation-contraction coupling in smooth muscle.** *Novartis Found Symp* (2002) **246**(154-168; discussion 168-173, 221-157).

28. Bonini MG, Augusto O: **Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite.** *J Biol Chem* (2001) **276**(13):9749-9754.

29. Boo YC, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, Jo H: **Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2002) **283**(5):H1819-1828.

30. Bourraindeloup M, Adamy C, Candiani G, Cailleret M, Bourin MC, Badoual T, Su JB, Adubeiro S, Roudot-Thoraval F, Dubois-Rande JL, Hittinger L *et al*: **N-acetylcysteine treatment normalizes serum tumor necrosis factor-alpha level and hinders the progression of cardiac injury in hypertensive rats.** *Circulation* (2004) **110**(14):2003-2009.

31. Brosnan MJ: **One step beyond: glutathione peroxidase and endothelial dysfunction.** *Hypertension* (2008) **51**(4):825-826.

32. Buckley BJ, Whorton AR: **Adaptive responses to peroxynitrite: increased glutathione levels and cystine uptake in vascular cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* (2000) **279**(4):C1168-1176.

33. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH: **EDHF: bringing the concepts together.** *Trends Pharmacol Sci* (2002) **23**(8):374-380.

34. Butler KG: **Hemoglobin levels, cardiovascular disease, and left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. Case study of the anemic patient.** *Nephrol Nurs J* (2002) **29**(2):189-192.

35. Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, Cave AC, Shah AM: **Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy.** *Circ Res* (2003) **93**(9):802-805.

36. Cabassi A, Dumont EC, Girouard H, Bouchard JF, Le Jossec M, Lamontagne D, Besner JG, de Champlain J: **Effects of chronic N-acetylcysteine treatment on the actions of peroxynitrite on aortic vascular reactivity in hypertensive rats.** *J Hypertens* (2001) **19**(7):1233-1244.

37. Campbell WB, Harder DR: **Prologue: EDHF--what is it?** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2001) **280**(6):H2413-2416.

38. Cappola TP, Kass DA, Nelson GS, Berger RD, Rosas GO, Kobeissi ZA, Marban E, Hare JM: **Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.** *Circulation* (2001) **104**(20):2407-2411.

1. **Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico.** *Lancet* (1999) **354**(9177):447-455.

2. Adachi T, Cohen RA: **Decreased aortic glutathione levels may contribute to impaired nitric oxide-induced relaxation in hypercholesterolaemia.** *Br J Pharmacol* (2000) **129**(5):1014-1020.

3. Aikawa R, Nagai T, Tanaka M, Zou Y, Ishihara T, Takano H, Hasegawa H, Akazawa H, Mizukami M, Nagai R, Komuro I: **Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy.** *Biochem Biophys Res Commun* (2001) **289**(4):901-907.

4. Ait-Oufella H. ME, Guidet B., Offenstadt g.: **The endothelium : a new organ.** *Réanimation* (2007) **17**(2):126-136.

5. Akki A, Zhang M, Murdoch C, Brewer A, Shah AM: **NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function.** *J Mol Cell Cardiol* (2009) **47**(1):15-22.

6. Alfonso-Prieto M, Biarnes X, Vidossich P, Rovira C: **The molecular mechanism of the catalase reaction.** *J Am Chem Soc* (2009) **131**(33):11751-11761.
7. Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL: **Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction.** *Circulation* (2004) **110**(15):2233-2240.
8. Andrews NP, Prasad A, Quyyumi AA: **N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function.** *J Am Coll Cardiol* (2001) **37**(1):117-123.
9. Arehart E, Gleim S, Kasza Z, Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J: **Prostacyclin, atherothrombosis, and cardiovascular disease.** *Curr Med Chem* (2007) **14**(20):2161-2169.
10. Arstall MA, Yang J, Stafford I, Betts WH, Horowitz JD: **N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effects.** *Circulation* (1995) **92**(10):2855-2862.
11. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA: **N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency.** *Curr Opin Pharmacol* (2007) **7**(4):355-359.
12. Aubin MC, Carrier M, Shi YF, Tardif JC, Perrault LP: **Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy.** *J Cardiovasc Pharmacol* (2006) **47**(5):702-710.

13. Aubin MC, Gendron ME, Lebel V, Thorin E, Tardif JC, Carrier M, Perrault LP: **Alterations in the endothelial G-protein coupled receptor pathway in epicardial arteries and subendocardial arterioles in compensated left ventricular hypertrophy.** *Basic Res Cardiol* (2007) **102**(2):144-153.
14. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM: **Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions.** *Hypertension* (1990) **15**(6 Pt 2):699-703.
15. Aucoin MM, Barhoumi R, Kochevar DT, Granger HJ, Burghardt RC: **Oxidative injury of coronary venular endothelial cells depletes intracellular glutathione and induces HSP 70 mRNA.** *Am J Physiol* (1995) **268**(4 Pt 2):H1651-1658.
16. Babior BM: **NADPH oxidase: an update.** *Blood* (1999) **93**(5):1464-1476.
17. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T: **Mitochondria, oxidants, and aging.** *Cell* (2005) **120**(4):483-495.
18. Bauml MA, Underwood DA: **Left ventricular hypertrophy: an overlooked cardiovascular risk factor.** *Cleve Clin J Med* (2010) **77**(6):381-387.
19. Bayir H, Kagan VE: **Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory.** *Crit Care* (2008) **12**(1):206.
20. Behrendt D, Ganz P: **Endothelial function. From vascular biology to clinical applications.** *Am J Cardiol* (2002) **90**(10C):40L-48L.

21. Bendall JK, Heymes C, Ratajczak P, Samuel JL: **Extracellular matrix and cardiac remodelling.** *Arch Mal Coeur Vaiss* (2002) **95**(12):1226-1229.

22. Berry CE, Hare JM: **Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications.** *J Physiol* (2004) **555**(Pt 3):589-606.

23. Bevers LM, Braam B, Post JA, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, Koomans HA, Verhaar MC, Joles JA: **Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase.** *Hypertension* (2006) **47**(1):87-94.

24. Blank RS, Owens GK: **Platelet-derived growth factor regulates actin isoform expression and growth state in cultured rat aortic smooth muscle cells.** *J Cell Physiol* (1990) **142**(3):635-642.

25. Blumenfeld JD, Sealey JE, Mann SJ, Bragat A, Marion R, Pecker MS, Sotelo J, August P, Pickering TG, Laragh JH: **Beta-adrenergic receptor blockade as a therapeutic approach for suppressing the renin-angiotensin-aldosterone system in normotensive and hypertensive subjects.** *Am J Hypertens* (1999) **12**(5):451-459.

26. Bohm F, Pernow J: **The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease.** *Cardiovasc Res* (2007) **76**(1):8-18.

27. Bolton TB, Gordienko DV, Pucovsky V, Parsons S, Povstyan O: **Calcium release events in excitation-contraction coupling in smooth muscle.** *Novartis Found Symp* (2002) **246**(154-168; discussion 168-173, 221-157).

28. Bonini MG, Augusto O: **Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite.** *J Biol Chem* (2001) **276**(13):9749-9754.

29. Boo YC, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, Jo H: **Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2002) **283**(5):H1819-1828.

30. Bourraindeloup M, Adamy C, Candiani G, Cailleret M, Bourin MC, Badoual T, Su JB, Adubeiro S, Roudot-Thoraval F, Dubois-Rande JL, Hittinger L *et al*: **N-acetylcysteine treatment normalizes serum tumor necrosis factor-alpha level and hinders the progression of cardiac injury in hypertensive rats.** *Circulation* (2004) **110**(14):2003-2009.

31. Brosnan MJ: **One step beyond: glutathione peroxidase and endothelial dysfunction.** *Hypertension* (2008) **51**(4):825-826.

32. Buckley BJ, Whorton AR: **Adaptive responses to peroxynitrite: increased glutathione levels and cystine uptake in vascular cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* (2000) **279**(4):C1168-1176.

33. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH: **EDHF: bringing the concepts together.** *Trends Pharmacol Sci* (2002) **23**(8):374-380.

34. Butler KG: **Hemoglobin levels, cardiovascular disease, and left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. Case study of the anemic patient.** *Nephrol Nurs J* (2002) **29**(2):189-192.

35. Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, Cave AC, Shah AM: **Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy.** *Circ Res* (2003) **93**(9):802-805.

36. Cabassi A, Dumont EC, Girouard H, Bouchard JF, Le Jossec M, Lamontagne D, Besner JG, de Champlain J: **Effects of chronic N-acetylcysteine treatment on the actions of peroxynitrite on aortic vascular reactivity in hypertensive rats.** *J Hypertens* (2001) **19**(7):1233-1244.

37. Campbell WB, Harder DR: **Prologue: EDHF--what is it?** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2001) **280**(6):H2413-2416.

38. Cappola TP, Kass DA, Nelson GS, Berger RD, Rosas GO, Kobeissi ZA, Marban E, Hare JM: **Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.** *Circulation* (2001) **104**(20):2407-2411.

39. Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Ferrari R, Albertini A, Visioli O: **The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: effects of N-acetyl cysteine.** *J Mol Cell Cardiol* (1988) **20**(1):5-13.

40. Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, Beltrami AP, Hintze TH, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P: **Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy.** *Circ Res* (2001) **89**(3):279-286.

41. Channon KM: **Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease.** *Trends Cardiovasc Med* (2004) **14**(8):323-327.

42. Chauhan SD, Hobbs AJ, Ahluwalia A: **C-type natriuretic peptide: new candidate for endothelium-derived hyperpolarising factor.** *Int J Biochem Cell Biol* (2004) **36**(10):1878-1881.

43. Chen C, Fang W: **[Advances in the study on animal models of ventricular hypertrophy and the effects of Chinese traditional drugs against ventricular hypertrophy].** *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* (2003) **28**(4):299-302.

44. Chen DD, Chen AF: **CuZn superoxide dismutase deficiency: culprit of accelerated vascular aging process.** *Hypertension* (2006) **48**(6):1026-1028.

45. Cheng TH, Cheng PY, Shih NL, Chen IB, Wang DL, Chen JJ: **Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts.** *J Am Coll Cardiol* (2003) **42**(10):1845-1854.

46. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA: **Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂.** *Science* (2002) **296**(5567):539-541.

47. Cheung PY, Schulz R: **Glutathione causes coronary vasodilation via a nitric oxide- and soluble guanylate cyclase-dependent mechanism.** *Am J Physiol* (1997) **273**(3 Pt 2):H1231-1238.

48. Chilian WM, Koshida R: **EDHF and NO: different pathways for production--similar actions.** *Circ Res* (2001) **89**(8):648-649.

49. Choukroun EM, Labrousse LM, Madonna FP, Deville C: **Mobile thrombus of the thoracic aorta: diagnosis and treatment in 9 cases.** *Ann Vasc Surg* (2002) **16**(6):714-722.

50. Chrissobolis S, Didion SP, Kinzenbaw DA, Schrader LI, Dayal S, Lentz SR, Faraci FM: **Glutathione peroxidase-1 plays a major role in protecting against angiotensin II-induced vascular dysfunction.** *Hypertension* (2008) **51**(4):872-877.

51. Cohen TJ, Klein J: **Cardiac resynchronization therapy for treatment of chronic heart failure.** *J Invasive Cardiol* (2002) **14**(1):48-53.

52. Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS: **Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein.** *Circulation* (1999) **100**(22):2210-2212.

53. Cotgreave IA, Berggren M, Jones TW, Dawson J, Moldeus P: **Gastrointestinal metabolism of N-acetylcysteine in the rat, including an assay for sulfite in biological systems.** *Biopharm Drug Dispos* (1987) **8**(4):377-386.

54. Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, Kim HS, Smithies O, Le TH, Coffman TM: **Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney.** *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) **103**(47):17985-17990.

55. Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Lentz SR: **Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2002) **22**(12):1996-2002.

56. De Flora S, Bennicelli C, Camoirano A, Serra D, Romano M, Rossi GA, Morelli A, De Flora A: **In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds.** *Carcinogenesis* (1985) **6**(12):1735-1745.

57. de Vries N, De Flora S: **N-acetyl-L-cysteine.** *J Cell Biochem* (1993) **17F**(S270-277).

58. Desjardins F, Aubin MC, Carrier M, Perrault LP: **Decrease of endothelin receptor subtype ETB and release of COX-derived products contribute to endothelial dysfunction of porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy.** *J Cardiovasc Pharmacol* (2005) **45**(6):499-508.

59. Diep QN, El Mabrouk M, Yue P, Schiffrin EL: **Effect of AT(1) receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin II-induced hypertension.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2002) **282**(5):H1635-1641.

60. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM: **Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration.** *FEBS Lett* (2000) **477**(3):258-262.

61. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM: **Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.** *Nature* (1999) **399**(6736):601-605.

62. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM: **Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide.** *Circ Res* (1997) **81**(6):970-976.

63. Dimmeler S, Zeiher AM: **Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors.** *Regul Pept* (2000) **90**(1-3):19-25.

64. Diniz YS, Rocha KK, Souza GA, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Novelli Filho JL, Cicogna AC, Novelli EL: **Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats.** *Eur J Pharmacol* (2006) **543**(1-3):151-157.

65. Dobrina A, Patriarca P: **Neutrophil-endothelial cell interaction. Evidence for and mechanisms of the self-protection of bovine microvascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress.** *J Clin Invest* (1986) **78**(2):462-471.

66. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH: **K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries.** *Nature* (1998) **396**(6708):269-272.

67. Ellis A, Triggle CR: **Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone.** *Can J Physiol Pharmacol* (2003) **81**(11):1013-1028.

68. Engberding N, Spiekermann S, Schaefer A, Heineke A, Wiencke A, Muller M, Fuchs M, Hilfiker-Kleiner D, Hornig B, Drexler H, Landmesser U: **Allopurinol attenuates left ventricular remodeling and dysfunction after experimental myocardial infarction: a new action for an old drug?** *Circulation* (2004) **110**(15):2175-2179.

69. Faraci FM, Didion SP: **Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2004) **24**(8):1367-1373.

70. Feletou M, Huang Y, Vanhoutte PM: **Vasoconstrictor prostanoids.** *Pflugers Arch.*
71. Feletou M, Huang Y, Vanhoutte PM: **Vasoconstrictor prostanoids.** *Pflugers Arch* (2010) **459**(6):941-950.
72. Feletou M, Vanhoutte PM: **EDHF: an update.** *Clin Sci (Lond)* (2009) **117**(4):139-155.
73. Feletou M, Vanhoutte PM, Verbeuren TJ: **The thromboxane/endoperoxide receptor (TP): the common villain.** *J Cardiovasc Pharmacol* (2010) **55**(4):317-332.
74. Feletou M, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM: **Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors.** *Br J Pharmacol* (2009) **156**(4):563-574.
75. Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J: **Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle.** *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2007) **82**(1-4):109-118.
76. Fetalvero KM, Shyu M, Nomikos AP, Chiu YF, Wagner RJ, Powell RJ, Hwa J, Martin KA: **The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2006) **290**(4):H1337-1346.

77. Fleming I: **Myoendothelial gap junctions: the gap is there, but does EDHF go through it?** *Circ Res* (2000) **86**(3):249-250.
78. Fleming I: **Cytochrome p450 and vascular homeostasis.** *Circ Res* (2001) **89**(9):753-762.
79. Fleming I, Busse R: **Signal transduction of eNOS activation.** *Cardiovasc Res* (1999) **43**(3):532-541.
80. Fleming I, Busse R: **Vascular cytochrome P450 in the regulation of renal function and vascular tone: EDHF, superoxide anions and blood pressure.** *Nephrol Dial Transplant* (2001) **16**(7):1309-1311.
81. Fleming I, Busse R: **Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2003) **284**(1):R1-12.
82. Forgione MA, Cap A, Liao R, Moldovan NI, Eberhardt RT, Lim CC, Jones J, Goldschmidt-Clermont PJ, Loscalzo J: **Heterozygous cellular glutathione peroxidase deficiency in the mouse: abnormalities in vascular and cardiac function and structure.** *Circulation* (2002) **106**(9):1154-1158.
83. Forgione MA, Weiss N, Heydrick S, Cap A, Klings ES, Bierl C, Eberhardt RT, Farber HW, Loscalzo J: **Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2002) **282**(4):H1255-1261.
84. Fridovich I: **Superoxide radical: an endogenous toxicant.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1983) **23**:239-257.

85. Fridovich I: **Superoxide dismutases: regularities and irregularities.** *Harvey Lect* (1983) **79**(51-75).
86. Gavish D, Breslow JL: **Lipoprotein(a) reduction by N-acetylcysteine.** *Lancet* (1991) **337**(8735):203-204.
87. George J, Struthers AD: **Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress.** *Vasc Health Risk Manag* (2009) **5**(1):265-272.
88. Ghigo D, Alessio P, Foco A, Bussolino F, Costamagna C, Heller R, Garbarino G, Pescarmona GP, Bosia A: **Nitric oxide synthesis is impaired in glutathione-depleted human umbilical vein endothelial cells.** *Am J Physiol* (1993) **265**(3 Pt 1):C728-732.
89. Gleim S, Kasza Z, Martin K, Hwa J: **Prostacyclin receptor/thromboxane receptor interactions and cellular responses in human atherothrombotic disease.** *Curr Atheroscler Rep* (2009) **11**(3):227-235.
90. Gombert-Maitland M, Preston IR: **Prostacyclin therapy for pulmonary arterial hypertension: new directions.** *Semin Respir Crit Care Med* (2005) **26**(4):394-401.
91. Gonzalez DR, Beigi F, Treuer AV, Hare JM: **Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) **104**(51):20612-20617.

92. Grange RW, Isotani E, Lau KS, Kamm KE, Huang PL, Stull JT: **Nitric oxide contributes to vascular smooth muscle relaxation in contracting fast-twitch muscles.** *Physiol Genomics* (2001) **5**(1):35-44.
93. Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC: **Caveolae and caveolins in the cardiovascular system.** *Circ Res* (2004) **94**(11):1408-1417.
94. Greenwel P, Dominguez-Rosales JA, Mavi G, Rivas-Estilla AM, Rojkind M: **Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited alpha1(I) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells.** *Hepatology* (2000) **31**(1):109-116.
95. Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: **NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.** *Circ Res* (2000) **86**(5):494-501.
96. Grieve DJ, MacCarthy PA, Gall NP, Cave AC, Shah AM: **Divergent biological actions of coronary endothelial nitric oxide during progression of cardiac hypertrophy.** *Hypertension* (2001) **38**(2):267-273.
97. Griscavage JM, Hobbs AJ, Ignarro LJ: **Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds.** *Adv Pharmacol* (1995) **34**:215-234.
98. Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ: **Serine and cysteine proteinase inhibitors prevent nitric oxide production by activated macrophages by interfering with transcription of the inducible NO synthase gene.** *Biochem Biophys Res Commun* (1995) **215**(2):721-729.

99. Groen HJ, Meijer C, De Vries EG, Mulder NH: **Red blood cell glutathione levels in lung cancer patients treated by radiation and continuously infused carboplatin.** *Anticancer Res* (1996) **16**(2):1033-1037.

100. Hall E. J: *Guyton and Hall Physiology Review*. Elsevier science, Boston (2005).

101. Halliwell B: **Biochemistry of oxidative stress.** *Biochem Soc Trans* (2007) **35**(Pt 5):1147-1150.

102. Hamanishi T, Furuta H, Kato H, Doi A, Tamai M, Shimomura H, Sakagashira S, Nishi M, Sasaki H, Sanke T, Nanjo K: **Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in japanese type 2 diabetic patients.** *Diabetes* (2004) **53**(9):2455-2460.

103. Hamilton CA, McPhaden AR, Berg G, Pathi V, Dominiczak AF: **Is hydrogen peroxide an EDHF in human radial arteries?** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2001) **280**(6):H2451-2455.

104. Hang CH, Shi JX, Sun BW, Li JS: **Apoptosis and functional changes of dipeptide transporter (PepT1) in the rat small intestine after traumatic brain injury.** *J Surg Res* (2007) **137**(1):53-60.

105. Heeba G, Hassan MK, Khalifa M, Malinski T: **Adverse balance of nitric oxide/peroxynitrite in the dysfunctional endothelium can be reversed by statins.** *J Cardiovasc Pharmacol* (2007) **50**(4):391-398.

106. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y: **Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases.** *Circ J* (2009) **73**(3):411-418.

107. Higgins P, Dawson J, Walters M: **The potential for xanthine oxidase inhibition in the prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular disease.** *Cardiovasc Psychiatry Neurol* (2009) **2009**(282059).
108. Horinaka S, Kobayashi N, Yagi H, Mori Y, Matsuoka H: **Nicorandil but not ISDN upregulates endothelial nitric oxide synthase expression, preventing left ventricular remodeling and degradation of cardiac function in Dahl salt-sensitive hypertensive rats with congestive heart failure.** *J Cardiovasc Pharmacol* (2006) **47**(5):629-635.
109. Hulvey MK, Frankenfeld CN, Lunte SM: **Separation and detection of peroxynitrite using microchip electrophoresis with amperometric detection.** *Anal Chem* (2010) **82**(5):1608-1611.
110. Hunter JC, Zeidan A, Javadov S, Kilic A, Rajapurohitam V, Karmazyn M: **Nitric oxide inhibits endothelin-1-induced neonatal cardiomyocyte hypertrophy via a RhoA-ROCK-dependent pathway.** *J Mol Cell Cardiol* (2009) **47**(6):810-818.
111. Igarashi J, Erwin PA, Dantas AP, Chen H, Michel T: **VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**(19):10664-10669.
112. Iglarz M, Clozel M: **Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction.** *J Cardiovasc Pharmacol* (2007) **50**(6):621-628.
113. Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G: **Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as**

- relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle.** *J Pharmacol Exp Ther* (1988) **246**(1):218-226.
114. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G: **Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation.** *J Pharmacol Exp Ther* (1988) **244**(1):181-189.
 115. Issels RD, Nagele A, Eckert KG, Wilmanns W: **Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine.** *Biochem Pharmacol* (1988) **37**(5):881-888.
 116. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A: **Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice.** *Cardiovasc Diabetol* (2005) **4**(1):5.
 117. Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM: **Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase.** *FASEB J* (2006) **20**(9):1546-1548.
 118. Julius M, Lang CA, Gleiberman L, Harburg E, DiFranceisco W, Schork A: **Glutathione and morbidity in a community-based sample of elderly.** *J Clin Epidemiol* (1994) **47**(9):1021-1026.
 119. Kamoun WS, Karaa A, Kresge N, Merkel SM, Korneszczuk K, Clemens MG: **LPS inhibits endothelin-1-induced endothelial NOS activation in hepatic sinusoidal cells through a negative feedback involving caveolin-1.** *Hepatology* (2006) **43**(1):182-190.

120. Kass DA, Takimoto E, Nagayama T, Champion HC: **Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling.** *Cardiovasc Res* (2007) **75**(2):303-314.
121. Kawakami A, Nakashima T, Tsuboi M, Urayama S, Matsuoka N, Ida H, Kawabe Y, Sakai H, Migita K, Aoyagi T, Nakashima M *et al*: **Insulin-like growth factor I stimulates proliferation and Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts.** *Biochem Biophys Res Commun* (1998) **247**(1):46-51.
122. Kazerounian S, Pitari GM, Ruiz-Stewart I, Schulz S, Waldman SA: **Nitric oxide activation of soluble guanylyl cyclase reveals high and low affinity sites that mediate allosteric inhibition by calcium.** *Biochemistry* (2002) **41**(10):3396-3404.
123. Kedzierski RM, Yanagisawa M: **Endothelin system: the double-edged sword in health and disease.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2001) **41**(851-876).
124. Kelly GS: **Clinical applications of N-acetylcysteine.** *Altern Med Rev* (1998) **3**(2):114-127.
125. Kerksick C, Willoughby D: **The antioxidant role of glutathione and N-acetylcysteine supplements and exercise-induced oxidative stress.** *J Int Soc Sports Nutr* (2005) **2**(38-44).
126. Kim F, Gallis B, Corson MA: **TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* (2001) **280**(5):C1057-1065.

127. King GL, Loeken MR: **Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications.** *Histochem Cell Biol* (2004) **122**(4):333-338.

128. Korkmaz Y, Bloch W, Addicks K, Schneider K, Baumann MA, Raab WH: **The Basal phosphorylation sites of endothelial nitric oxide synthase at serine (Ser)1177, Ser116, and threonine (Thr)495 in rat molar epithelial rests of Malassez.** *J Periodontol* (2005) **76**(9):1513-1519.

129. Kothapalli D, Flores-Stewart SA, Assoian RK: **Antimitogenic effects of prostacyclin on the G1 phase cyclin-dependent kinases.** *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2005) **78**(1-4):3-13.

130. Kugiyama K, Ohgushi M, Motoyama T, Hirashima O, Soejima H, Misumi K, Yoshimura M, Ogawa H, Sugiyama S, Yasue H: **Intracoronary infusion of reduced glutathione improves endothelial vasomotor response to acetylcholine in human coronary circulation.** *Circulation* (1998) **97**(23):2299-2301.

131. Kupatt C, Hinkel R, von Bruhl ML, Pohl T, Horstkotte J, Raake P, El Aouni C, Thein E, Dimmeler S, Feron O, Boekstegers P: **Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium.** *J Am Coll Cardiol* (2007) **49**(14):1575-1584.

132. Kwon KY, Jang JH, Kwon SY, Cho CH, Oh HK, Kim SP: **Cadmium induced acute lung injury and TUNEL expression of apoptosis in respiratory cells.** *J Korean Med Sci* (2003) **18**(5):655-662.

133. Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK: **Oxidative stress in cardiovascular disease.** *Indian J Biochem Biophys* (2009) **46**(6):421-440.

134. Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW: **Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium.** *Am J Physiol* (1997) **273**(1 Pt 1):L119-126.

135. Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK: **Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways.** *Circ Res* (2001) **88**(9):888-894.

136. Lemarie CA, Schiffrin EL: **The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease.** *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* (2010) **11**(1):19-31.

137. Li CJ, Elsasser TH, Kahl S: **AKT/eNOS signaling module functions as a potential feedback loop in the growth hormone signaling pathway.** *J Mol Signal* (2009) **4**(1).

138. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM: **Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure.** *Hypertension* (2002) **40**(4):477-484.

139. Li YZ, Li CJ, Pinto AV, Pardee AB: **Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells.** *Mol Med* (1999) **5**(4):232-239.

140. Lincoln TM, Cornwell TL, Komalavilas P, Boerth N: **Cyclic GMP-dependent protein kinase in nitric oxide signaling.** *Methods Enzymol* (1996) **269**(149-166).

141. Liu CQ, Leung FP, Wong SL, Wong WT, Lau CW, Lu L, Yao X, Yao T, Huang Y: **Thromboxane prostanoid receptor activation impairs endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxations: the role of Rho kinase.** *Biochem Pharmacol* (2009) **78**(4):374-381.
142. Liu Q, Wang G, Zhou G, Tan Y, Wang X, Wei W, Liu L, Xue W, Feng W, Cai L: **Angiotensin II-induced p53-dependent cardiac apoptotic cell death: its prevention by metallothionein.** *Toxicol Lett* (2009) **191**(2-3):314-320.
143. Liu VW, Huang PL: **Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice.** *Cardiovasc Res* (2008) **77**(1):19-29.
144. Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, Pollock DM, Pollock JS: **Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta.** *J Pharmacol Exp Ther* (2005) **315**(3):1058-1064.
145. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: **Nitric oxide: a physiologic messenger.** *Ann Intern Med* (1994) **120**(3):227-237.
146. Ma YH, Gebremedhin D, Schwartzman ML, Falck JR, Clark JE, Masters BS, Harder DR, Roman RJ: **20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is an endogenous vasoconstrictor of canine renal arcuate arteries.** *Circ Res* (1993) **72**(1):126-136.
147. Malo O, Carrier M, Shi YF, Tardif JC, Tanguay JF, Perrault LP: **Specific alterations of endothelial signal transduction pathways of porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy.** *J Cardiovasc Pharmacol* (2003) **42**(2):275-286.

148. Malo O, Desjardins F, Tanguay JF, Tardif JC, Carrier M, Perrault LP: **Tetrahydrobiopterin and antioxidants reverse the coronary endothelial dysfunction associated with left ventricular hypertrophy in a porcine model.** *Cardiovasc Res* (2003) **59**(2):501-511.

149. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M: **Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview.** *FEBS J* (2008) **275**(15):3959-3970.

150. Matsubara M, Titani K, Taniguchi H: **Interaction of calmodulin-binding domain peptides of nitric oxide synthase with membrane phospholipids: regulation by protein phosphorylation and Ca(2+)-calmodulin.** *Biochemistry* (1996) **35**(46):14651-14658.

151. Mayer B, Schmidt K, Humbert P, Bohme E: **Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca2+-dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase.** *Biochem Biophys Res Commun* (1989) **164**(2):678-685.

152. Mayer B, Schrammel A, Klatt P, Koesling D, Schmidt K: **Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation.** *J Biol Chem* (1995) **270**(29):17355-17360.

153. McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H, Harrison DG: **Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2003) **285**(6):H2290-2297.

154. Meininger CJ, Marinos RS, Hatakeyama K, Martinez-Zaguilan R, Rojas JD, Kelly KA, Wu G: **Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of**

- the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency.** *Biochem J* (2000) **349**(Pt 1):353-356.
155. Metrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel JL, Heymes C, Morel E, Lezoualc'h F: **Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy.** *Circ Res* (2008) **102**(8):959-965.
 156. Michel T: **NO way to relax: the complexities of coupling nitric oxide synthase pathways in the heart.** *Circulation* (2010) **121**(4):484-486.
 157. Millea PJ: **N-acetylcysteine: multiple clinical applications.** *Am Fam Physician* (2009) **80**(3):265-269.
 158. Misra HP: **Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols.** *J Biol Chem* (1974) **249**(7):2151-2155.
 159. Molina CR, Andresen JW, Rapoport RM, Waldman S, Murad F: **Effect of in vivo nitroglycerin therapy on endothelium-dependent and independent vascular relaxation and cyclic GMP accumulation in rat aorta.** *J Cardiovasc Pharmacol* (1987) **10**(4):371-378.
 160. Morinelli TA, Walker LP, Ullian ME: **COX-2 expression stimulated by Angiotensin II depends upon AT1 receptor internalization in vascular smooth muscle cells.** *Biochim Biophys Acta* (2008) **1783**(6):1048-1054.
 161. Morrison JA, Jacobsen DW, Sprecher DL, Robinson K, Khoury P, Daniels SR: **Serum glutathione in adolescent males predicts parental coronary heart disease.** *Circulation* (1999) **100**(22):2244-2247.

162. Mukherjee TK, Mishra AK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR: **High concentration of antioxidants N-acetylcysteine and mitoquinone-Q induces intercellular adhesion molecule 1 and oxidative stress by increasing intracellular glutathione.** *J Immunol* (2007) **178**(3):1835-1844.

163. Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A: **Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2005) **25**(8):1551-1557.

164. Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM: **NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure.** *Cardiovasc Res* (2006) **71**(2):208-215.

165. Muthumala A, Drenos F, Elliott PM, Humphries SE: **Role of beta adrenergic receptor polymorphisms in heart failure: systematic review and meta-analysis.** *Eur J Heart Fail* (2008) **10**(1):3-13.

166. Muzykantov VR: **Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium.** *J Control Release* (2001) **71**(1):1-21.

167. Myers PR, Minor RL, Jr., Guerra R, Jr., Bates JN, Harrison DG: **Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide.** *Nature* (1990) **345**(6271):161-163.

168. Nakagami H, Takemoto M, Liao JK: **NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy.** *J Mol Cell Cardiol* (2003) **35**(7):851-859.

169. Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T, Namba M: **Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II.** *Circulation* (1998) **98**(8):794-799.

170. Nakata K, Kawase M, Ogino S, Kinoshita C, Murata H, Sakaue T, Ogata K, Ohmori S: **Effects of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and an attempt to replenish hepatic glutathione level of mouse with cysteine derivatives.** *Mech Ageing Dev* (1996) **90**(3):195-207.

171. Nayeem MA, Poloyac SM, Falck JR, Zeldin DC, Ledent C, Ponnoth DS, Ansari HR, Mustafa SJ: **Role of CYP epoxygenases in A2A AR-mediated relaxation using A2A AR-null and wild-type mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2008) **295**(5):H2068-2078.

172. Numaguchi Y, Naruse K, Harada M, Osanai H, Mokuno S, Murase K, Matsui H, Toki Y, Ito T, Okumura K, Hayakawa T: **Prostacyclin synthase gene transfer accelerates reendothelialization and inhibits neointimal formation in rat carotid arteries after balloon injury.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1999) **19**(3):727-733.

173. Nuttall SL, Martin U, Sinclair AJ, Kendall MJ: **Glutathione: in sickness and in health.** *Lancet* (1998) **351**(9103):645-646.

174. Ortolani O, Conti A, De Gaudio AR, Masoni M, Novelli G: **Protective effects of N-acetylcysteine and rutin on the lipid peroxidation of the lung epithelium during the adult respiratory distress syndrome.** *Shock* (2000) **13**(1):14-18.

175. Ortolani O, Conti A, De Gaudio AR, Moraldi E, Cantini Q, Novelli G: **The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock.** *Am J Respir Crit Care Med* (2000) **161**(6):1907-1911.

176. Oshino N, Chance B: **Properties of glutathione release observed during reduction of organic hydroperoxide, demethylation of aminopyrine and oxidation of some substances in perfused rat liver, and their implications for the physiological function of catalase.** *Biochem J* (1977) **162**(3):509-525.

177. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.** *Physiol Rev* (2007) **87**(1):315-424.

178. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C: **Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol.** *Pharmacol Rev* (2006) **58**(1):87-114.

179. Pagano A, Donati Y, Metrailler I, Barazzone Argiroffo C: **Mitochondrial cytochrome c release is a key event in hyperoxia-induced lung injury: protection by cyclosporin A.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2004) **286**(2):L275-283.

180. Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE: **Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms.** *J Biol Chem* (2002) **277**(50):48403-48409.

181. Palmer LA, Doctor A, Chhabra P, Sheram ML, Laubach VE, Karlinsey MZ, Forbes MS, Macdonald T, Gaston B: **S-nitrosothiols signal hypoxia-mimetic vascular pathology.** *J Clin Invest* (2007) **117**(9):2592-2601.

182. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: **Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.** *Nature* (1987) **327**(6122):524-526.
183. Paravicini TM, Touyz RM: **NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities.** *Diabetes Care* (2008) **31 Suppl 2**(S170-180).
184. Parkington HC, Tare M, Coleman HA: **The EDHF story: the plot thickens.** *Circ Res* (2008) **102**(10):1148-1150.
185. Patel JC: **Functions of endothelium.** *Indian J Med Sci* (2001) **55**(3):165-166.
186. Peltonen T, Taskinen P, Napankangas J, Leskinen H, Ohtonen P, Soini Y, Juvonen T, Satta J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H: **Increase in tissue endothelin-1 and ETA receptor levels in human aortic valve stenosis.** *Eur Heart J* (2009) **30**(2):242-249.
187. Pendergrass KD, Gwathmey TM, Michalek RD, Grayson JM, Chappell MC: **The angiotensin II-AT1 receptor stimulates reactive oxygen species within the cell nucleus.** *Biochem Biophys Res Commun* (2009) **384**(2):149-154.
188. Phelps DT, Deneke SM, Daley DL, Fanburg BL: **Elevation of glutathione levels in bovine pulmonary artery endothelial cells by N-acetylcysteine.** *Am J Respir Cell Mol Biol* (1992) **7**(3):293-299.
189. Pollock DM: **Endothelin, angiotensin, and oxidative stress in hypertension.** *Hypertension* (2005) **45**(4):477-480.

190. Postea O, Krotz F, Henger A, Keller C, Weiss N: **Stereospecific and redox-sensitive increase in monocyte adhesion to endothelial cells by homocysteine.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2006) **26**(3):508-513.

191. Prasad A, Andrews NP, Padder FA, Husain M, Quyyumi AA: **Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability.** *J Am Coll Cardiol* (1999) **34**(2):507-514.

192. Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R: **Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups.** *Biochem J* (1997) **322** (Pt 1)(167-173.

193. Rajappan K, Melina G, Bellenger NG, Amrani M, Khaghani A, Pennell DJ, Yacoub MH: **Evaluation of left ventricular function and mass after Medtronic Freestyle versus homograft aortic root replacement using cardiovascular magnetic resonance.** *J Heart Valve Dis* (2002) **11**(1):60-65; discussion 66.

194. Ramzy D, Rao V, Tumati LC, Xu N, Sheshgiri R, Miriuka S, Delgado DH, Ross HJ: **Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway.** *Circulation* (2006) **114**(1 Suppl):I319-326.

195. Ray R, Shah AM: **NADPH oxidase and endothelial cell function.** *Clin Sci (Lond)* (2005) **109**(3):217-226.

196. Reudelhuber TL, Bernstein KE, Delafontaine P: **Is angiotensin II a direct mediator of left ventricular hypertrophy? Time for another look.** *Hypertension* (2007) **49**(6):1196-1201.

197. Rojkind M, Dominguez-Rosales JA, Nieto N, Greenwel P: **Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses.** *Cell Mol Life Sci* (2002) **59**(11):1872-1891.

198. Rosenberg RD: **Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism.** *Am J Med* (1989) **87**(3B):2S-9S.

199. Ruffmann R, Wendel A: **GSH rescue by N-acetylcysteine.** *Klin Wochenschr* (1991) **69**(18):857-862.

200. Sabri A, Byron KL, Samarel AM, Bell J, Lucchesi PA: **Hydrogen peroxide activates mitogen-activated protein kinases and Na⁺-H⁺ exchange in neonatal rat cardiac myocytes.** *Circ Res* (1998) **82**(10):1053-1062.

201. Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA: **Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes.** *Antioxid Redox Signal* (2003) **5**(6):731-740.

202. Sabri A, Wilson BA, Steinberg SF: **Dual actions of the Galpha(q) agonist Pasteurella multocida toxin to promote cardiomyocyte hypertrophy and enhance apoptosis susceptibility.** *Circ Res* (2002) **90**(8):850-857.

203. Salido G.M. RJA: **Apoptosis: Involvement of Oxidative Stress and Intracellular Ca²⁺ Homeostasis**
In: Springer, Spain (2009).

204. Sampson LJ, Plane F, Garland CJ: **Involvement of cyclic GMP and potassium channels in relaxation evoked by the nitric oxide donor, diethylamine**

- NONOate, in the rat small isolated mesenteric artery.** *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* (2001) **364**(3):220-225.
205. Sanders DB, Kelley T, Larson D: **The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control.** *Perfusion* (2000) **15**(2):97-104.
 206. Savage HR, Kissane JQ, Becher EL, Maddocks WQ, Murtaugh JT, Dizadji H: **Analysis of ambulatory electrocardiograms in 14 patients who experienced sudden cardiac death during monitoring.** *Clin Cardiol* (1987) **10**(11):621-632.
 207. Schmitt CA, Heiss EH, Aristei Y, Severin T, Dirsch VM: **Norfuraneol dephosphorylates eNOS at threonine 495 and enhances eNOS activity in human endothelial cells.** *Cardiovasc Res* (2009) **81**(4):750-757.
 208. Sessa WC: **Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2005) **100** Suppl 1(15-18).
 209. Siems WG, van Kuijk FJ, Maass R, Brenke R: **Uric acid and glutathione levels during short-term whole body cold exposure.** *Free Radic Biol Med* (1994) **16**(3):299-305.
 210. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS: **Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts.** *Am J Physiol Cell Physiol* (2001) **280**(1):C53-60.
 211. Sjodin K, Nilsson E, Hallberg A, Tunek A: **Metabolism of N-acetyl-L-cysteine. Some structural requirements for the deacetylation and consequences for the oral bioavailability.** *Biochem Pharmacol* (1989) **38**(22):3981-3985.

212. Sochman J, Vrbska J, Musilova B, Rocek M: **Infarct Size Limitation: acute N-acetylcysteine defense (ISLAND trial): preliminary analysis and report after the first 30 patients.** *Clin Cardiol* (1996) **19**(2):94-100.

213. Song P, Zhang M, Wang S, Xu J, Choi HC, Zou MH: **Thromboxane A2 receptor activates a Rho-associated kinase/LKB1/PTEN pathway to attenuate endothelium insulin signaling.** *J Biol Chem* (2009) **284**(25):17120-17128.

214. Sorescu D, Griending KK: **Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure.** *Congest Heart Fail* (2002) **8**(3):132-140.

215. Spinale FG: **The bioactive peptide endothelin causes multiple biologic responses relevant to myocardial and vascular performance after cardiac surgery.** *J Thorac Cardiovasc Surg* (2002) **123**(6):1031-1034.

216. Spinale FG: **Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart.** *Circ Res* (2002) **90**(5):520-530.

217. Stamler JS, Slivka A: **Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease.** *Nutr Rev* (1996) **54**(1 Pt 1):1-30.

218. Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Namsolleck P, Grzesiak A, Funke-Kaiser H, Bader M, Unger T: **The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation.** *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* (2010) **11**(1):67-73.

219. Stewart SA, Kothapalli D, Yung Y, Assoian RK: **Antimitogenesis linked to regulation of Skp2 gene expression.** *J Biol Chem* (2004) **279**(28):29109-29113.
220. Stull LB, Leppo MK, Szweda L, Gao WD, Marban E: **Chronic treatment with allopurinol boosts survival and cardiac contractility in murine postischemic cardiomyopathy.** *Circ Res* (2004) **95**(10):1005-1011.
221. Suttorp N, Simon LM: **Importance of the glutathione redox cycle for the resistance of lung epithelial cells against a polymorphonuclear leukocyte-mediated oxidant attack.** *Biochem Pharmacol* (1986) **35**(13):2268-2270.
222. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R: **Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics.** *Nat Rev Drug Discov* (2007) **6**(8):662-680.
223. Takaya T, Hirata K, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Inoue N, Yada T, Goto M, Fukatsu A, Hayashi T, Alp NJ *et al*: **A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2007) **27**(7):1632-1637.
224. Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA: **Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy.** *Nat Med* (2005) **11**(2):214-222.
225. Takimoto E, Kass DA: **Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling.** *Hypertension* (2007) **49**(2):241-248.

226. Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, Levy BI: **Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways.** *Lab Invest* (2002) **82**(6):747-756.

227. Tanaka K, Honda M, Takabatake T: **Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte.** *J Am Coll Cardiol* (2001) **37**(2):676-685.

228. Tfelt-Hansen J, Ferreira A, Yano S, Kanuparthi D, Romero JR, Brown EM, Chattopadhyay N: **Calcium-sensing receptor activation induces nitric oxide production in H-500 Leydig cancer cells.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2005) **288**(6):E1206-1213.

229. Toborek M, Barger SW, Mattson MP, McClain CJ, Hennig B: **Role of glutathione redox cycle in TNF-alpha-mediated endothelial cell dysfunction.** *Atherosclerosis* (1995) **117**(2):179-188.

230. Toborek M, Lee YW, Garrido R, Kaiser S, Hennig B: **Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells.** *Am J Clin Nutr* (2002) **75**(1):119-125.

231. Toborek M, Lee YW, Kaiser S, Hennig B: **Measurement of inflammatory properties of fatty acids in human endothelial cells.** *Methods Enzymol* (2002) **352**:198-219.

232. Todd AS: **The histological localisation of fibrinolysin activator.** *J Pathol Bacteriol* (1959) **78**:281-283.

233. Topal G, Brunet A, Millanvoye E, Boucher JL, Rendu F, Devynck MA, David-Dufilho M: **Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin.** *Free Radic Biol Med* (2004) **36**(12):1532-1541.
234. Topol EJ, Califf, R.M.: **Textbook of cardiovascular medicine.** In: 355. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2007).
235. Tsai MH, Jiang MJ: **Reactive oxygen species are involved in regulating alpha1-adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction.** *J Biomed Sci* (2010) **17**(67).
236. Tsutsui T, Hori T, Shimizu M, Tatsuzawa C, Kawakami E: **Effect of osaterone acetate administration on prostatic regression rate, peripheral blood hormone levels and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy.** *J Vet Med Sci* (2001) **63**(4):453-456.
237. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T *et al*: **Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation.** *J Clin Invest* (1999) **104**(7):925-935.
238. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Lyons PR, Lassegue B, Griendling KK: **Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells.** *Mol Pharmacol* (1999) **55**(1):142-149.
239. Vacheron A: **[Cardiovascular disease prevention. Strategy of the French Federation of Cardiology].** *Bull Acad Natl Med* (1990) **174**(2):219-225; discussion 225-230.

240. Vacheron A: **[Interventional cardiology in adults]**. *Bull Acad Natl Med* (1991) **175**(7):1091-1095.
241. Vacheron A: **[Strategy of the french cardiology association in the prevention of coronary disease]**. *Arch Mal Coeur Vaiss* (1992) **85**(2):165-167.
242. Vacheron A: **[Coronary surgery and its alternatives. Introductive essay]**. *Chirurgie* (1992) **118**(8):423.
243. Vane JR, Botting RM: **Pharmacodynamic profile of prostacyclin**. *Am J Cardiol* (1995) **75**(3):3A-10A.
244. Vanhoutte PM: **[Role of the endothelium in the function of vascular fibers]**. *J Pharmacol* (1983) **14 Suppl 3**(73-79).
245. Vanhoutte PM: **Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease**. *Circ J* (2003) **67**(7):572-575.
246. Vanhoutte PM: **[The endothelium: thirty years of surprises]**. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* (2008) **57**(3):133-135.
247. Vanhoutte PM, Tang EH: **Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad!** *J Physiol* (2008) **586**(Pt 22):5295-5304.
248. von Harsdorf R, Hauck L, Mehrhof F, Wegenka U, Cardoso MC, Dietz R: **E2F-1 overexpression in cardiomyocytes induces downregulation of p21CIP1 and**

- p27KIP1 and release of active cyclin-dependent kinases in the presence of insulin-like growth factor I.** *Circ Res* (1999) **85**(2):128-136.
249. Wang Z, Kolega J, Hoi Y, Gao L, Swartz DD, Levy EI, Mocco J, Meng H: **Molecular alterations associated with aneurysmal remodeling are localized in the high hemodynamic stress region of a created carotid bifurcation.** *Neurosurgery* (2009) **65**(1):169-177; discussion 177-168.
 250. Watanabe H, Tran QK, Takeuchi K, Fukao M, Liu MY, Kanno M, Hayashi T, Iguchi A, Seto M, Ohashi K: **Myosin light-chain kinase regulates endothelial calcium entry and endothelium-dependent vasodilation.** *FASEB J* (2001) **15**(2):282-284.
 251. Watanabe T, Barker TA, Berk BC: **Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects.** *Hypertension* (2005) **45**(2):163-169.
 252. Wei L, Wang L, Carson JA, Agan JE, Imanaka-Yoshida K, Schwartz RJ: **beta1 integrin and organized actin filaments facilitate cardiomyocyte-specific RhoA-dependent activation of the skeletal alpha-actin promoter.** *FASEB J* (2001) **15**(3):785-796.
 253. Wei S, Rothstein EC, Fliegel L, Dell'Italia LJ, Lucchesi PA: **Differential MAP kinase activation and Na(+)/H(+) exchanger phosphorylation by H(2)O(2) in rat cardiac myocytes.** *Am J Physiol Cell Physiol* (2001) **281**(5):C1542-1550.
 254. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER: **The structure and function of the endothelial glycocalyx layer.** *Annu Rev Biomed Eng* (2007) **9**(121-167).

255. Weir EK, Archer SL: **The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels.** *FASEB J* (1995) **9**(2):183-189.
256. Weiss JR, Kopecky KJ, Godwin J, Anderson J, Willman CL, Moysich KB, Slovak ML, Hoque A, Ambrosone CB: **Glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1 and GSTA1) polymorphisms and outcomes after treatment for acute myeloid leukemia: pharmacogenetics in Southwest Oncology Group (SWOG) clinical trials.** *Leukemia* (2006) **20**(12):2169-2171.
257. Wiklund O, Fager G, Andersson A, Lundstam U, Masson P, Hultberg B: **N-acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels.** *Atherosclerosis* (1996) **119**(1):99-106.
258. Wise H, Jones RL: **Focus on prostacyclin and its novel mimetics.** *Trends Pharmacol Sci* (1996) **17**(1):17-21.
259. Wolin MS: **Reactive oxygen species and the control of vascular function.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2009) **296**(3):H539-549.
260. Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA: **Superoxide in the vascular system.** *J Vasc Res* (2002) **39**(3):191-207.
261. Wright MM, Schopfer FJ, Baker PR, Vidyasagar V, Powell P, Chumley P, Iles KE, Freeman BA, Agarwal A: **Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) **103**(11):4299-4304.

262. Wu L, Juurlink BH: **The impaired glutathione system and its up-regulation by sulforaphane in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats.** *J Hypertens* (2001) **19**(10):1819-1825.

263. Xia SW, Wang H, Zhang Y: **[Therapeutic effect of reduced glutathione on neonatal hypoxic-ischemic myocardial lesions].** *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* (2006) **8**(4):341-342.

264. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL: **Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process.** *J Biol Chem* (1998) **273**(40):25804-25808.

265. Xiao L, Pimental DR, Amin JK, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS: **MEK1/2-ERK1/2 mediates α 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes.** *J Mol Cell Cardiol* (2001) **33**(4):779-787.

266. Xin Y, Song X, Xue H, Liu Z, Wang X, Wang H, Sun K, Bai Y, Liu J, Hui R: **A common variant of the eNOS gene (E298D) is an independent risk factor for left ventricular hypertrophy in human essential hypertension.** *Clin Sci (Lond)* (2009) **117**(2):67-73.

267. Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS: **Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation.** *Science* (1998) **279**(5348):234-237.

268. Xu Y, Buikema H, van Gilst WH, Henning RH: **Caveolae and endothelial dysfunction: filling the caves in cardiovascular disease.** *Eur J Pharmacol* (2008) **585**(2-3):256-260.

269. Yamaguchi O, Higuchi Y, Hirotsu S, Kashiwase K, Nakayama H, Hikoso S, Takeda T, Watanabe T, Asahi M, Taniike M, Matsumura Y *et al*: **Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**(26):15883-15888.

270. Yamamoto Y, Watari Y, Brydun A, Yoshizumi M, Akishita M, Horiuchi M, Chayama K, Oshima T, Ozono R: **Role of the angiotensin II type 2 receptor in arterial remodeling after wire injury in mice.** *Hypertens Res* (2008) **31**(6):1241-1249.

271. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P: **Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators.** *N Engl J Med* (2000) **342**(3):154-160.

272. Zachara BA, Gromadzinska J, Wasowicz W, Zbrog Z: **Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review.** *Acta Biochim Pol* (2006) **53**(4):663-677.